위대한 김일성동지와 김정일동지는
영원히 우리와 함께 계신다

김일성종합대학학보

생명과학

제65권

JOURNAL OF **KIM IL SUNG** UNIVERSITY

Life Science Vol. 65 No. 4



김일성종합대학출판사

4

주체108(2019)

김일성종합대학학보 주체108(2019)년 제65권 제4호
생 명 과 학 (루계 제579호)

차 례

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

알용후보닭의 뇌하수체의 조직학적구조변화에 미치는 NMA의 영향

림고근, 박철해, 김정실

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리는 자체의 원료에 의거한 먹이첨가제생산방법을 연구완성하여 축산기지운영에 필요한 먹이첨가제를 생산보장하도록 하여야 합니다.》

NMA(N－메틸－D,L－아스파라긴산)는 글루타민산접수체에 작용하여 시구하부에서 GHRH의 분비를 강화함으로써 뇌하수체전엽에서 GH의 합성과 분비를 촉진시킨다.[4, 5]

그러나 NMA가 알용후보닭의 뇌하수체의 조직학적구조를 변화시킨다는 연구자료는 제기된것이 없다.

우리는 글루타민산접수체가운데서 중요한 NMDA접수체의 활성을 높이는 NMDA의 협동체인 NMA를 동물성장 및 번식촉진제로 리용하기 위하여 NMA를 알용후보닭에게 배합먹이와 섞어먹이면서 뇌하수체의 조직학적구조변화에 미치는 영향을 연구하였다.

재료와 방법

시험에 리용한 닭으로는 정주닭AB(♂)×만경닭ㅆ(♀) 1대잡종알용닭을 리용하였다. 대조무리와 시험무리를 각각 150마리로 하고 시험무리에는 NMA를 몸질량 1kg당 1.0mg씩 배합먹이에 골고루 섞어먹이면서 증체률과 육성률을 측정하였다. 실험마감날인 105날나이에 대조무리와 시험무리에서 각각 10마리씩 선정하여 뇌하수체를 떼내고 그 질량을 전자천평에서 측정하였다. 다음 10% 중성포르말린에서 24h 고정하고 세척, 탈수, 크실롤투명, 파라핀포매과정을 거친 후 5μm 두께로 절편을 만들어 헤마톡실린－에오진(H-E)염색하여 조직표본을 만들었다.

뇌하수체전엽의 동일한 조건면적안에 들어있는 총세포수와 호산성세포수, 호염기성세포수, 난염성세포수는 매 표본의 임의의 세곳에서 생물현미경(《OLYMPUS BH-2》, 10×40배)으로 조건면적(390μm×390μm)안에 나타나는 세포수를 세고 평균하는 방법으로 얻었다.

결과 및 론의

먼저 알용후보닭에 NMA를 몸질량 1kg당 1.0mg씩 섞어먹인 105날나이의 시험무리와 대조무리에서 각각 10마리씩 임의로 선정하여 뇌하수체의 질량을 측정하였다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 NMA를 적용한 시험

표 1. 알용후보닭의 뇌하수체질량에 미치는 NMA의 영향

구분	시험개체수/마리	뇌하수체	
		질량/mg	비률/%
대조무리	10	5.2±0.2	100.0
시험무리	10	6.1±0.2*	117.3

* $p<0.05$

무리에서 뇌하수체의 질량은 6.1mg으로서 대조무리에 비하여 117.3%로 유의성있게 증가하였다.

다음 뇌하수체조직표본을 만들고 표본중심부에 정한 임의의 3개 구역의 조건면적안에 나타난 총세포수와 호산성세포수, 호염기성세포수, 난염성세포수를 측정하였다.(사진, 표 2)

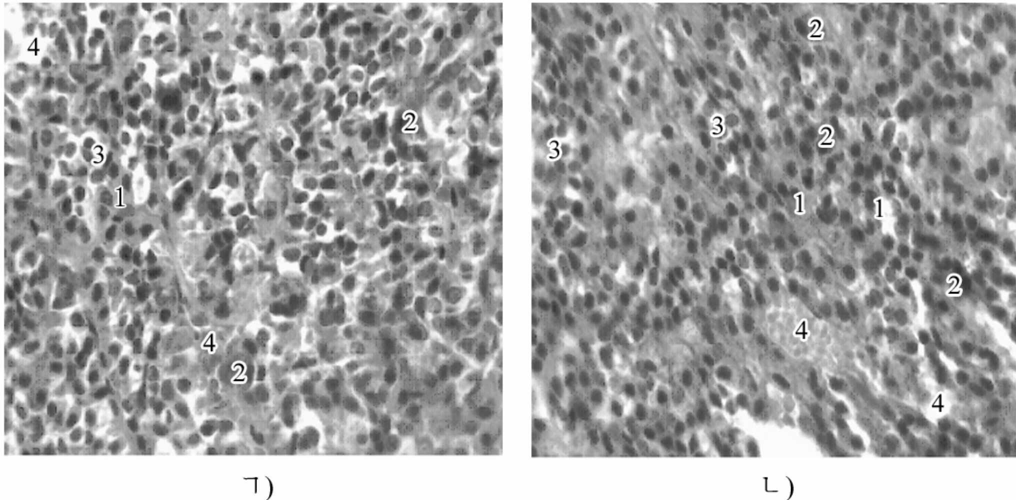


사진. 알용후보닭의 뇌하수체(×400배)

ㄱ) 대조무리, ㄴ) 시험무리

1－호산성세포, 2－호염기성세포, 3－난염성세포, 4－동양모세혈관

표 2. 뇌하수체의 각이한 염색성세포수에 미치는 NMA의 영향

구 분	마리수 /마리	총세포수 /개	호산성 세포수/개	호염기성 세포수/개	난염성 세포수/개
대조무리	10	81.8±4.3(100%)	23.2±2.1(28.4%)	13.1±1.2(16.0%)	45.5±2.3(55.6%)
시험무리	10	82.7±3.5(100%)	31.8±1.6*(38.4%)	18.2±1.3*(22.1%)	32.7±1.7*(39.5%)
대조무리에 대한 시험무리의 비률	－	－	137.1	138.9	71.9

* $p<0.05$, 괄호안의 수자는 대조무리와 시험무리에서 조건면적안에 나타나는 총세포수에 대한 각이한 염색성세포들의 비률(%)임

사진과 표 2에서 보는바와 같이 대조무리에 비하여 NMA를 적용한 시험무리에서 뇌하수체의 호산성세포수는 137.1%, 호염기성세포수는 138.9%로 유의성있게 증가하였으며 난염성세포수는 71.9%로 유의성있게 감소하였다.

뇌하수체에서 호산성세포는 GH와 PRL의 합성과 분비에 관계되는 세포이고 호염기성세포는 ACTH, TSH, 란포자극호르몬(follicle-stimulating hormone: FSH), 황체형성호르몬(luteinizing hormone: LH)의 합성과 분비에 관계되는 세포이다. 뇌하수체의 호산성세포와 호염기성세포들에서의 호르몬합성 및 분비기능은 시구하부의 방출 및 억제호르몬들의 조절을 받는다.

NMA가 알용후보닭에서 뇌하수체의 호산성세포수와 호염기성세포수를 늘이는 작용을 한다는 실험자료는 NMA가 시구하부의 Glu친화성신경원들의 흥분성을 높여 소마토리베린과 고나도리베린의 분비를 활성화하여 뇌하수체전엽으로부터 호르몬합성 및 분비기능을 조절한다는 선행연구자료[1－3, 5]와 일치한다.

맺 는 말

NMA를 몸질량 1kg당 1.0mg씩 배합먹이에 섞어 알용후보닭에 적용할 때 대조무리에 비하여 뇌하수체의 질량은 117.3%로 증가된다.

NMA를 몸질량 1kg당 1.0mg씩 배합먹이에 섞어 알용후보닭에 적용할 때 대조무리에 비하여 뇌하수체의 호산성세포수와 호염기성세포수는 대조무리에 비하여 각각 137.1, 138.9%로 더 높아지고 뇌하수체의 난염성세포수는 71.9%로 감소한다.

참 고 문 헌

[1] A. Z. Ruiz; R. Bras. Zootec., 43, 4, 183, 2014.
[2] Joel R. Meyerson et al.; Nature, 514, 16, 328, 2014.
[3] M. J. Estienne et al.; Journal of Animal Science, 78, 2, 365, 2000.
[4] R. Barb et al.; J. Anim. Sci., 80, 1, 623, 2002.
[5] Kenji Hashimoto; The NMDA Receptors, Humana Press, 15～43, 2017.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Effect of NMA on Changes of Histological Structure of the Pituitary Gland of Candidate Chickens for Egg Production

Rim Ko Gun, Pak Chol Hae and *Kim Jong Sil*

When we feed NMA with concentration of 1.0mg per 1kg body weight to candidate chickens for egg production, the mass of pituitary gland increases to 117.3% compared with control group.

When we feed NMA with concentration of 1.0mg per 1kg body weight to candidate chickens for egg production, the number of eosinophiles and basophiles increases to 137.1% and 138.9% respectively compared with control group, and the number of trouble staining cells of pituitary gland reduces to 71.9%.

Key words: candidate chickens for egg production, pituitary gland, NMA

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

양파플라보노이드가 고지혈증흰쥐의 내당능 및 혈청기름질함량에 미치는 영향

문성규, 황덕만

산화적스트레스는 활성산소종이 많이 생겨나게 하는데 활성산소종의 증가로 항산화계가 비정상으로 되면 Ⅱ형당뇨병의 발병원인으로 되는 취장β－세포기능의 지속적인 손상이 촉진되게 된다.[3] 인슐린저항성과 취장β－세포의 인슐린분비에 대한 산화적손상은 Ⅱ형당뇨병의 발병원인에서 중요한 역할을 한다.[7]

플라보노이드는 산화적스트레스에 의한 조직의 손상을 감소시켜 취장β－세포기능을 보존하게 하여 Ⅱ형당뇨병에서 인슐린저항성의 증가를 막을수 있다.[5]

이로부터 우리는 양파플라보노이드가 고지혈증흰쥐의 내당능 및 혈청기름질함량에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

재료 평안남도 대동군에서 재배한 양파(*Allium cepa*)를 리용하였으며 양파의 플라보노이드는 선행방법[1]으로 추출하여 리용하였다.

실험동물로는 몸질량 17～23g 되는 흰생쥐, 몸질량 80～100g 되는 흰쥐, 몸질량 150～180g 되는 흰쥐를 암수구별없이 썼다.

양파플라보노이드의 안정성검사 급성독성은 양파플라보노이드를 증류수에 10% 되게 풀어 흰생쥐에게 각이한 용량으로 먹이되 최대용량 1mL/10g(10g/kg)까지 먹인 후 일반상태를 관찰하면서 72h동안 죽는 수를 관찰하는 방법으로 평가하였다.

아급성독성은 양파플라보노이드를 2g/(kg·d)씩 60일간 몸질량 80～100g 되는 흰쥐에게 먹이면서 15일 간격으로 몸질량과 말초피적혈구수 및 백혈구수, 혈청트란스아미나제를 검사하고 대조와 비교하는 방법으로 평가하였다.

내당능측정 혈당내림효과는 포도당부하시험(GTT)[6]으로 평가하였다.

고지혈증모형만들기 고지혈증모형은 흰쥐의 배안에 20% 트윈－80을 1mL/100g(0.2g/100g)을 주사하여 만들었다.

트윈－80배안주사후 9h만에 기름질지표들을 검사하였다.

기름질지표검사 혈청총콜레스테롤(TC)함량은 쟈크－헨리법[1], 혈청중성기름질(TG)함량은 n－헵탄아세틸아세톤법[2], 혈청고밀도저단백질콜레스테롤(HDL-C)함량은 린월프람산나트리움－염화마그네시움법[2], 혈청초저밀도기름단백질콜레스테롤(VLDL-C)함량과 혈청저밀도기름단백질콜레스테롤(LDL-C)함량은 Friedwarld식[4]으로 검사하였다.

결과 및 론의

1) 양파플라보노이드의 안정성

양파플라보노이드의 급성독성(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 1, 2, 4, 6, 8, 10g/kg까지 먹였을 때 죽은 동물은 한마리도 없었고 실험동물의 일반상태(행동상태, 먹이먹는 상태, 털상태 등)에서 특별한 소견은 없었다.

표 1. 양파플라보노이드의 급성독성(LD_{50})

실험무리 번호	적용량 $/(g\cdot kg^{-1})$	실험동물 수/마리	살아남은 수/마리	죽은 수 /마리
1	1	5	5	0
2	2	5	5	0
3	4	5	5	0
4	6	5	5	0
5	8	5	5	0
6	10	5	5	0

양파플라보노이드의 아급성독성 양파플라보노이드가 흰쥐몸질량에 미치는 영향을 검사한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 양파플라보노이드가 흰쥐몸질량에 미치는 영향

무리	적용량 $/(g\cdot kg^{-1})$	적용전 몸질량/g	적용후 날자별 몸질량/g			
			15d	30d	45d	60d
대조(n=10)	－	90.5±1.24	101.4±2.17	119.7±2.24	131.4±2.53	142.1±3.02
실험(n=10)	2.0	91.7±1.17	105.4±2.16	123.4±2.57	135.6±3.03	144.7±2.73

표 2에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 먹인 실험조에서는 검사전기간 흰쥐의 몸질량에서 유의한 변화가 나타나지 않았다.

양파플라보노이드가 흰쥐의 말초피적혈구수에 미치는 영향을 검사한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 양파플라보노이드가 흰쥐말초피적혈구수에 미치는 영향

무리	적용량 $/(g\cdot kg^{-1})$	적용전 적혈구수 $/(T\cdot L^{-1})$	적용후 날자별 적혈구수 $/(T\cdot L^{-1})$			
			15d	30d	45d	60d
대조(n=10)	－	7.2±0.45	7.7±0.47	7.5±0.47	8.1±0.58	7.8±0.52
실험(n=10)	2.0	7.3±0.47	7.6±0.51	7.4±0.39	7.9±0.53	8.0±0.63

표 3에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 먹인 실험조에서는 검사전기간 적혈구수에서 대조무리와 유의한 차이가 나타나지 않았다.

양파플라보노이드가 흰쥐말초피백혈구수에 미치는 영향을 검사한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 양파플라보노이드가 흰쥐말초피백혈구수에 미치는 영향

무리	적용량 $/(g\cdot kg^{-1})$	적용전 백혈구수 $/(G\cdot L^{-1})$	적용후 날자별 백혈구수 $/(G\cdot L^{-1})$			
			15d	30d	45d	60d
대조(n=10)	－	8.5±0.61	9.1±0.73	8.7±0.58	8.9±0.63	9.2±0.58
실험(n=10)	2.0	8.7±0.57	8.9±0.66	9.1±0.64	8.8±0.67	9.1±0.54

표 4에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 먹인 실험조에서는 검사전기간 백혈구수에서 대조무리와 유의한 차이가 없었다.

양파플라보노이드가 흰쥐의 혈청GPT(글루타민－싱아초산아미노이전효소)활성에 미치는 영향을 검사하고 대조와 비교한 결과는 표 5와 같다.

표 5. 양파플라보노이드가 흰쥐의 혈청GPT활성에 미치는 영향

무리	적용량 /(g·kg^{-1})	적용전 GPT활성 /(U·L^{-1})	적용후 날자별 GPT활성 /(U·L^{-1})			
			15d	30d	45d	60d
대조(n=10)	—	25.1±0.47	24.7±0.45	26.8±0.54	25.7±0.53	26.1±0.48
실험(n=10)	2.0	25.3±0.38	26.4±0.51	27.7±0.58	25.6±0.47	26.7±0.44

표 5에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 먹인 실험조에서는 검사전기간 대조에 비하여 GPT활성에서 유의한 차이가 인정되지 않았다.

양파플라보노이드가 흰쥐의 혈청GOT(글루타민-피루빈산아미노이전효소)활성에 미치는 영향을 검사하고 대조와 비교한 결과는 표 6과 같다.

표 6. 양파플라보노이드가 흰쥐의 혈청GOT활성에 미치는 영향

무리	적용량 /(g·kg^{-1})	적용전 GOT활성 /(U·L^{-1})	적용후 날자별 GOT활성 /(U·L^{-1})			
			15d	30d	45d	60d
대조(n=10)	—	34.5±1.07	35.3±2.05	40.2±2.24	39.7±1.94	38.8±1.76
실험(n=10)	2.0	35.1±2.14	34.8±2.13	41.1±3.26	38.6±2.18	37.6±2.23

표 6에서 보는바와 같이 양파플라보노이드를 먹인 실험조에서는 검사전기간 대조에 비하여 혈청GOT활성에서 유의한 변화가 나타나지 않았다.

2) 양파플라보노이드의 적용량에 따르는 내당능

양파플라보노이드의 적용량을 각이하게 하고 흰쥐의 내당능을 검사한 결과는 표 7과 같다.

표 7에서 보는바와 같이 200mg/kg의 량으로 먹인 무리에서는 포도당부하후 혈당이 대조무리에 비하여 유의한 차이가 없었으나 400mg/kg의 량으로 먹인 무리에서는 포도당부하후 혈당이 대조무리에 비하여 유의하게 감소되였다.

3) 양파플라보노이드가 혈청기름질지표에 미치는 영향

양파플라보노이드를 포도당부하후 혈당의 유의한 감소를 나타내는 400mg/kg의 량으로 먹이였을 때의 혈청기름질지표들을 검사하였다.

총콜레스테롤(TC)함량에 미치는 영향 TC함량검사결과는 표 8과 같다.

표 7. 양파플라보노이드의 투여량에 따르는 내당능

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	빈속혈당 /(mg·dL^{-1})	포도당부하후 혈당 /(mg·dL^{-1})
대조 (n=7)	—	91.2±7.66	145.5±10.43
시험 (n=7)	200	90.7±5.95	135.1±8.41
	400	90.5±6.73	111.2±6.05*

* p<0.05(대조와 비교)

표 8. 양파플라보노이드가 TC함량에 미치는 영향

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	적용전TC함량 /(mg·dL^{-1})	적용후TC함량 /(mg·dL^{-1})
정상대조 (n=7)	—	97.2±6.11	96.5±6.73
모형대조 (n=7)	—	95.7±5.77	165.4±10.73△
실험(n=7)	400	96.2±6.24	124.4±7.03*

△ p<0.01(정상대조와 비교), * p<0.05(모형대조와 비교)

표 8에서 보는바와 같이 양파플라보노이드는 고지혈증흰쥐의 TC함량을 모형대조(양파플라보노이드를 적용하지 않은 무리)에 비하여 뚜렷하게 낮추었다.

양파플라보노이드가 TG함량에 미치는 영향 양파플라보노이드를 섭취한 무리의 TG함량을 고지혈증모형대조와 비교한 결과는 표 9와 같다.

표 9. 양파플라보노이드가 TG함량에 미치는 영향

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	적용전TG함량 /(mg·dL^{-1})	적용후TG함량 /(mg·dL^{-1})
정상대조(n=7)	－	97.2±6.11	96.5±6.73
모형대조(n=7)	－	95.7±5.77	165.4±10.73$^{\triangle}$
실험(n=7)	400	96.2±6.24	124.4±7.03*

△ p<0.01(정상대조와 비교), * p<0.05(모형대조와 비교)

표 9에서 보는바와 같이 양파플라보노이드는 고지혈증모형대조에 비하여 TG함량을 뚜렷하게 저하시켰다.

양파플라보노이드가 HDL-C함량에 미치는 영향 양파플라보노이드를 고지혈증모형흰쥐에게 먹이고 HDL-C함량을 검사한 결과는 표 10과 같다.

표 10. 양파플라보노이드가 HDL-C함량에 미치는 영향

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	적용전HDL-C함량 /(mg·dL^{-1})	적용후HDL-C함량 /(mg·dL^{-1})
정상대조(n=7)	－	65.1±5.72	64.8±5.66
모형대조(n=7)	－	64.7±6.02	31.5±3.15$^{\triangle}$
실험(n=7)	400	63.7±5.94	48.5±4.03*

△ p<0.01(정상대조와 비교), * p<0.05(모형대조와 비교)

표 10에서 보는바와 같이 양파플라보노이드는 고지혈증모형대조에 비하여 혈청HDL-C함량을 뚜렷하게 증가시켰다.

양파플라보노이드가 LDL-C함량에 미치는 영향 양파플라보노이드를 고지혈증모형흰쥐에게 먹이고 LDL-C함량을 검사한 결과는 표 11과 같다.

표 11. 양파플라보노이드가 LDL-C함량에 미치는 영향

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	적용전LDL-C함량 /(mg·dL^{-1})	적용후LDL-C함량 /(mg·dL^{-1})
정상대조(n=7)	－	23.4±2.11	22.6±2.13
모형대조(n=7)	－	22.4±1.95	106.5±12.74$^{\triangle}$
실험(n=7)	400	23.8±1.85	55.6±9.46*

△ p<0.01(정상대조와 비교), * p<0.05(모형대조와 비교)

표 11에서 보는바와 같이 양파플라보노이드는 LDL-C함량을 고지혈증모형대조에 비하여 뚜렷하게 낮추었다.

양파플라보노이드가 VLDL-C함량에 미치는 영향 양파플라보노이드를 고지혈증흰쥐에게 먹이고 VLDL-C함량을 검사한 결과는 표 12와 같다.

표 12. 양파플라보노이드가 VLDL-C함량에 미치는 영향

무리	적용량 /(mg·kg^{-1})	적용전VLDL-C함량 /(mg·dL^{-1})	적용후VLDL-C함량 /(mg·dL^{-1})
정상대조(n=7)	－	8.62±0.81	9.02±0.86
모형대조(n=7)	－	8.56±0.78	27.42±1.53$^{\triangle}$
실험(n=7)	400	8.70±0.82	20.30±1.31*

△ p<0.01(정상대조와 비교), * p<0.05(모형대조와 비교)

표 12에서 보는바와 같이 양파플라보노이드주입무리의 VLDL-C함량은 모형대조에 비하여 뚜렷하게 저하되였다.

이상의 실험결과들은 양파플라보노이드가 고지혈증흰쥐에서 당뇨병예방에서 중요한 지표인 내당능을 높이는것과 함께 혈청기름질지표들을 개선하는 작용을 한다는것을 보여준다.

당뇨병에 걸리게 되는 주요원인의 하나는 산화적스트레스의 증가로 볼수 있는데 산화적스트레스의 증가로 인한 자유라디칼 혹은 활성산소종의 증가는 혈관질병을 일으키는 인자의 하나인 저밀도기름단백질의 산화를 일으키게 된다. 뿐만아니라 지속적인 고혈당과 산화적스트레스의 증가는 당뇨병으로 인한 합병증들에서 중요한 인자로 된다. 그러므로 활성산소종과 항산화제사이의 균형을 유지하는것은 산화적스트레스로 인한 질병예방에서 중요한 물림새로 된다.

양파는 기름질대사를 조절하고 고혈당을 억제하는 기능이 있는데 이것은 양파에 많이 들어있는 플라보노이드의 항산화기능과 련관되여있다고 볼수 있다.

맺 는 말

1) 양파플라보노이드의 LD_{50}은 10g/kg이상이며 아급성독성반응에서는 그 어떤 부정적 영향도 나타나지 않았다.

2) 양파플라보노이드는 고지혈증흰쥐의 내당능을 높이며 혈청기름질지표들인 TC, TG, LDL-C, VLDL-C함량을 낮추고 HDL-C함량을 높인다.

참 고 문 헌

[1] **김일성**종합대학학보 생명과학, 64, 3, 81, 주체107(2018).
[2] 맹주성; 림상생화학검사법, 과학백과사전출판사, 342～368, 1984.
[3] A. Ceriello et al.; Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 24, 816, 2004.
[4] W. T. Friedewald et al.; Clin. Chem., 8, 6, 499, 1972.
[5] P. Knekt et al.; Am. J. Clin. Nutr., 76, 560, 2002.
[6] M. F. Kasali et al.; Asian Pac. J. Trop. Biomed., 3, 11, 885, 2013.
[7] Xi Zhang et al.; North American Journal of Medicine and Science, 9, 1, 12, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

The Effect of Onion Flavonoid on Glucose Tolerance and Serum Lipid Content in Hyperlipidemic Rats

Mun Song Gyu, Hwang Tok Man

We evaluated the effect of onion flavonoid on serum lipid profile and glucose tolerance in hyperlipidemic rats. The dosage of 400 mg/kg is more effective than that of 200 mg/kg. These results suggest that the onion flavonoid possesses antidiabetic and hypolipidemic effects in hyperlipidemic rats.

Key words: onion, flavonoid, serum lipid, glucose tolerance

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

푸른인삼가루의 조성성분과 생물학적가치

박영기, 엄기수

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《푸른인삼은 영양가가 높습니다. 푸른인삼생산을 장려하여야 합니다.》

푸른인삼(*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.)은 무궁화과에 속하는 한해살이작물이다. 푸른인삼은 열대기원성식물로서 북부아프리카지역에서 야생적으로 자라던 식물을 재배화한것인데 그것의 놀라운 영양학적 및 보건효과가 알려지면서 세계의 거의 모든 지역으로 퍼지게 되였다.

세계적으로 푸른인삼은 남새작물로서 풋열매때 수확하여 료리로 가공하여 식생활에 리용하고있다. 푸른인삼을 커피대용원료로, 심장혈관질병들을 비롯한 각종 질병들을 치료하는 제약원료로 리용되고있는 자료들[1－4]은 많지만 씨를 가공하여 만든 가루제품에 대한 구체적인 분석자료는 제기되지 않았다.

이로부터 우리는 푸른인삼가루의 조성성분과 생물학적가치에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료로는 우리 나라에서 널리 재배되고있는 푸른인삼의 여문씨를 리용하였다.

푸른인삼가루는 푸른인삼씨를 깨끗이 정선한 다음 가열로에 넣고 1.1×10^6Pa의 높은 압력에서 폭쇄한 후에 제분기에서 가루를 내는 방법으로 제조하였다. 푸른인삼가루의 조성성분은 전문기관에 의뢰하여 분석하였다.

결과 및 론의

푸른인삼가루의 기본영양성분을 분석한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 푸른인삼가루의 기본영양성분

구분	함량/%	구분	함량/%
물기	6.5	섬유소	2.0
단백질	40.5	광물질	3.8
기름질	30.3	열량	2 100kJ·100g^{-1}
당질	16.9		

푸른인삼가루에는 물기가 6.5%, 단백질이 40.5%, 기름질이 30.3%, 당질이 16.9%, 섬유소가 2.0%, 광물질이 3.8% 들어있으며 열량은 2 100kJ/100g로서 매우 높은편이다. 특히 푸른인삼가루에는 기본3대영양물질인 단백질, 기름질, 당질의 함량이 높고 비교적 균형적으로 들어있을뿐아니라 단백질함량이 특히 높기때문에 더없이 좋은 영양식품으로, 단백질원천으로 된다.

푸른인삼가루의 생물활성물질에 대한 분석을 진행하였다.

푸른인삼가루의 아미노산조성과 함량을 분석한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 푸른인삼가루의 아미노산조성과 함량

아미노산종류	함량/($g\cdot100g^{-1}$)	아미노산종류	함량/($g\cdot100g^{-1}$)	아미노산종류	함량/($g\cdot100g^{-1}$)
아스파라긴산	7.20	알라닌	1.16	발린	1.02
글루타민산	7.32	프롤린	3.00	트립토판	1.16
세린	1.40	아르기닌	1.12	이소로이신	1.48
글리신	1.08	티로신	1.98	로이신	1.46
트레오닌	1.06	시스테인	0.88	페닐알라닌	1.26
히스티딘	1.06	메티오닌	0.88	리진	1.18

푸른인삼가루에는 모든 필수아미노산들이 골고루 들어있으면서 그것들의 함량이 비교적 높다. 푸른인삼가루에서 대부분의 아미노산들의 함량은 식물성식료품들가운데서 가장 높았다.

푸른인삼가루에서 비타민과 폴리페놀함량을 분석한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 푸른인삼가루의 비타민과 폴리페놀함량

비타민종류	함량/($mg\cdot100g^{-1}$)	비타민종류	함량/($mg\cdot100g^{-1}$)
C	438	B_2	—
PP	1.72	A	0.18
B_6	2.93	E	192
B_1	0.28	폴리페놀	516

표 3에서 보는바와 같이 항산화활성을 가지는 비타민C는 우리 나라의 식료품들가운데서 그 함량이 제일 높다고 하는 풋고추에 비하여 거의 3배나 많고 비타민E는 우리 나라 식료품들가운데서 제일 많이 들어있다고 하는 참깨보다도 거의 3.5배나 더 많이 포함되여있다.

푸른인삼가루에서 주요무기영양원소들의 함량을 분석한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 푸른인삼가루의 무기영양원소함량

구분	함량/($mg\cdot100g^{-1}$)	구분	함량/($mg\cdot100g^{-1}$)
칼시움	63	린	380
마그네시움	79	철	8.9
나트리움	98	아연	9.4
칼리움	74	동	1.7

표 4에서 보는바와 같이 푸른인삼가루에서 주요무기영양원소들의 함량은 일반적으로 다른 모든 식료품들과 류사하거나 높은 편이다.

종합적으로 말하여 푸른인삼가루는 기본영양성분과 생물활성성분을 다같이 함유하고 있고 그것들의 함량이 특별히 높은것으로 하여 매우 가치있는 건강식품으로 된다.

맺 는 말

푸른인삼가루는 기본영양물질들과 생물활성물질들이 풍부하고 조화롭게 함유되여있는 매우 가치있는 기능성식품으로 된다. 특히 푸른인삼가루에는 단백질이 40.5%나 들어있어 중요한 단백질영양원으로 될뿐아니라 항산화활성이 높은 비타민C와 E가 각각 435, 192mg%나 들어있으므로 건강장수에 더없이 좋은 건강장수식품으로 된다.

참 고 문 헌

[1] F. O. Adetuyi et al.; Nigerian Food Journal, 32, 2, 10, 2014.
[2] M. O. Nosiru et al.; Nigeria American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12, 12, 1572, 2012.
[3] E. C. Nwachukwu et al.; Advancement in Medicinal Plant Research, 2, 1, 16, 2014.
[4] P. P. Prayna et al.; Food Chemistry, 182, 1451, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Composition and the Biological Value of Okra Powder

Pak Yong Gi, Om Ki Su

The powder of okra is one of the very valuable functional foods, which contains a lot of major nutrients and the biological active materials in balance. In particular, the powder of okra is not only the important protein source containing 40.5% of proteins but also the precious macrobiotic material with the 435mg% of vitamin C and 192mg% of vitamin E, which are powerful antioxidants.

Key words: okra, biological active materials, antioxidative activity

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

류화철광미생물침출액의 벼종자소독효과

김경아, 차영학

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학자, 기술자들은 사회주의경제발전의 요구에 맞게 인민경제 모든 부문의 생산기술공정과 생산방법, 경영활동을 새로운 과학적토대우에 올려세우는데서 나서는 과학기술적문제를 전망성있게 풀어나가야 하겠습니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제11권 138페지)

철과 류황을 기본조성으로 하는 류화철광을 철산화세균과 류황산화세균으로 처리하면 철은 3가철이온형태로, 류황은 류산으로 산화되고 광석속에 포함되여있는 여러가지 무기원소들이 류산염형태로 풀린다.[4]

결과 미생물침출액에 3가철이 많이 들어있는것과 함께 pH가 낮으며 농작물생육에 필수적인 여러가지 다량 및 미량원소들이 적지 않게 포함되여있는것이 특징이다. 그러므로 류화철광미생물침출액으로 벼종자를 처리하면 종자소독효과와 함께 여러가지 영양원소처리효과도 나타낼수 있다.

우리는 류산철에 의한 벼종자소독방법[1－3]이 이미 확립된데 기초하여 자원이 풍부한 ㄹ지구의 류화철광을 미생물침출하여 벼종자소독에 리용하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

연구재료로 논벼(*Oryza sativa* L.)품종 《평양 53》호를 비롯한 몇가지 품종들을 리용하였다.

철산화세균 *Acidithiobacillus ferrooxidans*-2260과 류황산화세균 *Acidithiobacillus thiooxidans*-02를 리용하여 ㄹ지구의 청화제련미광인 류화철을 침출하는 방법으로 미생물침출액을 얻었다.

류화철광미생물침출액에 의한 벼종자소독은 류산철에 의한 벼종자소독[1－3]과 같은 방법으로 진행하고 감자즙배지를 리용하여 소독효과를 육안으로 확인하였다. 연구에서는 소독효과와 함께 처리한 벼종자의 싹트는힘과 싹트는률을 조사하였다.

결과 및 론의

1) 류화철광미생물침출액의 조성

벼종자소독에 리용하는 류화철광미생물침출액의 원소조성을 조사한 결과는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 류화철광미생물침출액에는 벼종자소독에 효과적으로 작용할 수 있는 Fe^{3+}이 2.3% 포함되여있었는데 Fe^{3+}이 0.005mol/L이상의 농도에서 벼종자에 대한 억균효과를 나타낸다는 선행연구자료[1－3]에 비추어볼 때 류화철광미생물침출액을 벼종자소독에 리용할수 있다고 본다. 류화철광미생물침출액속에는 또한 S, Ca, K, Mg, P, Zn, Cu,

Mn 등 여러가지 다량 및 미량원소들이 들어있다. 류화철광미생물침출액의 pH는 1.4정도였다.

표 1. 류화철광미생물침출액(원액)의 몇가지 원소조성

No.	원소	함량/%	No.	원소	함량/%
1	Fe^{3+}	2.3	10	Mg^{2+}	0.9×10^{-3}
2	SO_4^{2-}	1.98	11	Ni^{2+}	0.4×10^{-3}
3	Ca^{2+}	0.34	12	P^{5+}	0.8×10^{-3}
4	Na^{+}	1.2×10^{-2}	13	Cr^{3+}	0.2×10^{-3}
5	Zn^{2+}	8.6×10^{-3}	14	Pb^{2+}	5.4×10^{-5}
6	Cu^{2+}	7.6×10^{-3}	15	As^{5+}	7.0×10^{-6}
7	Mn^{2+}	4.7×10^{-3}	16	Au^{+}	4×10^{-4}
8	K^{+}	4.5×10^{-3}	17	Ag^{+}	8×10^{-3}
9	Rb^{+}	1.1×10^{-3}			

2) 벼종자소독에 미치는 류화철광미생물침출액처리의 효과

보관하였던 벼종자를 류화철광미생물침출액에 각이한 시간동안 담그었다가 무균적으로 꺼내여 감자즙배지에 넣고 배양하는 방법으로 벼종자소독에 미치는 류화철광미생물침출액의 소독효과를 판정하였다.(표 2)

표 2에서 보는바와 같이 벼종자를 미생물침출원액(표 1)에 담근 시간이 길어짐에 따라 균자란 정도는 약해졌지만 완전히 소독되지는 않았으며 다른 희석액들에서는 균이 적지 않게 자랐다. 이것은 벼종자를 침출액에 담그기만 하여서는 소독이 완전하게 되지 않는다는것을 보여준다.

그러므로 우리는 선행연구방법[1－3]에 준하여 류화철광미생물침출액에 의한 마른씨앗소독방법을 적용하였다. 즉 각이한 희석배수의 침출액에 30, 60, 120min 담그었던 벼종자를 멸균한 젖은 려지에 싸서 무균적으로 샤레에 넣고 2일동안 25℃ 온도에서 젖은 상태로 놓아두었다가 같은 온도에서 5일동안 무균적으로 말리웠다. 마른 종자를 감자즙배지에 넣고 소독효과를 관찰하였다.(표 3)

표 2. 각이한 희석배수의 류화철미생물침출액에 담근 벼종자의 소독효과

희석배수	종자담근 시간/d	균자란 정도
침출원액	1	++++
	2	+++
	3	++
	4	+
10배	1	+++++
	2	+++++
	3	++++
	4	++++
50배	1	++++++
	2	++++++
	3	+++++
	4	+++++

품종《평양 53》호, 침출액에 담그었던 벼종자를 25℃ 감자즙배지에 5d동안 넣음
\+ 균자란 정도를 표시

표 3에서 보는바와 같이 원액과 10배희석액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자는 완전히 소독되였다. 그리고 미생물침출원액과 10배희석액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 다른 3개의 벼품종들에서도 모두 뚜렷한 소독효과가 나타났다.(표 4)

표 3. 류화철광미생물침출액의 희석배수에 따르는 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자의 소독효과

희석배수	종자담근시간/min	소독효과
대조		++++++
원액	30	–
	60	–
	120	–
10배	30	–
	60	–
	120	–
50배	30	+++
	60	+++
	120	++

품종《평양 53》호, 무지기는 25℃에서 2d간, 말리기는 25℃에서 5d간 진행, 소독효과확인은 표 2와 같음, + 균자란 정도, – 소독됨

표 4. 류화철광미생물침출액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 몇가지 벼품종의 소독효과

품종	대조	원액	10배
《평도 22》호	+++++	–	–
《평양 49》호	+++++	–	–
《서해찰 16》호	+++++	–	–

침출액에 종자담근 시간 60min, 무지기와 말리기 조건은 표 3에서와 같음

3) 벼종자싹트기에 미치는 류화철광미생물침출액처리의 효과

앞에서 본바와 같이 류화철광미생물침출액은 벼종자에 대한 소독효과를 가질뿐아니라 싹트기에도 좋은 영향을 주었다.

벼종자싹트기에 미치는 류화철광미생물침출액처리의 효과를 시험하기 위하여 원액과 10배희석액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자의 싹트는힘과 싹트는률을 조사하였다.(표 5)

표 5. 류화철광미생물침출액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자의 싹트기

희석배수	싹트는힘/%	싹트는률/%
대조	40.0	82.5±3.5
원액	57.5	94.6±2.3
10배	58.7	92.8±4.2

품종《평양 53》호, 시험조건은 표 4에서와 같음

표 5에서 보는바와 같이 원액과 10배희석액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자의 싹트는힘과 싹트는률은 대조에 비하여 현저하게 높았다.

이상과 같이 류화철광미생물침출액에는 벼종자에 대한 소독작용을 하는 Fe^{3+}과 여러가지 다량 및 미량원소들이 적지 않게 들어있고 용액의 pH가 산성(원액의 pH 1.4)을 띠는것으로 하여 소독제로써만이 아니라 영양원소종자처리제로도 리용할수 있다고 본다.

맺 는 말

1) 류화철광미생물침출원액과 10배희석액에 30min이상 담그었던 벼종자를 25℃ 온도에서 2일동안 젖은채로 무져놓았다가 5일이상 말리우면 완전히 소독된다.

2) 류화철광미생물침출원액과 10배희석액에 담그기, 무지기, 말리기를 진행한 벼종자의 싹트는힘과 싹트는률은 대조에 비하여 뚜렷하게 높아진다.

참 고 문 헌

[1] **김일성**종합대학학보(자연과학), 45, 2, 54, 주체88(1999).

[2] **김일성**종합대학학보(자연과학), 54, 12, 128, 주체97(2008).

[3] 엄기수 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 6, 48, 주체95(2006).

[4] Lili Wang et al.; Chemical Engineering Journal, 350, 5, 429, 2018.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Sterilizing Effect on Rice Seed by Bio-Leachate of Pyrite

Kim Kyong A, Cha Yong Hak

The sterilizing effect on rice seed by the bio-leachate of pyrite was studied.

When leaving the rice seed wet for 2 days at 25℃ and drying up to 5 days–it had been socked in bio-leachate of pyrite or its 10-time-diluted solution for more than 30 minutes, the rice seed was completely sterilized.

The germinating energy and the germinating rate of the treated rice seed were higher than t he control's.

Key words: seed disinfection, pyrite, bio-leaching

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

하밀참외의 합리적인 재배기술에 대한 연구

윤금별, 리세찬

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《농업생산에서 적지적작, 적기적작의 원칙을 지키는것은 우리 나라의 자연기후조건에서 더욱 중요한 문제로 나섭니다. 우리 나라는 세면이 바다로 둘러싸여있고 산이 많기때문에 기후의 변화가 심하며 지방마다, 골짜기마다 기후조건이 다르고 토양조건도 같지 않습니다. 이러한 실정을 고려하지 않고 일률적으로 작물과 품종을 배치하거나 영농방법과 영농기술을 적용한다면 농업을 발전시킬수 없습니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제21권 456페지)

하밀참외는(*Cucumis melo* L. var. *saccharinus* Naud.) 박과 참외류의 변종으로서 넌출성 열매작물이다.

하밀참외라는 이름은 2차원산지인 중국의 북서부에 위치한 신강자치구 하밀지방의 명칭으로부터 유래된것으로서 최근 중국을 비롯한 일부 나라들에서 재배되고있다.

이 참외는 맛과 향기, 약용적가치가 독특한것으로 하여 수요가 아주 높지만 기후와 풍토, 유전적특성과 재배기술적특성이 까다로운것으로 하여 원산지에서만큼 대량적으로 재배되지 못하고있다.

우리는 참외의 일종인 하밀참외를 우리 나라 조건에서 재배하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

시험재료로는 하밀참외선발계통들가운데서 섞붙임조합이 우수한 계통간1대잡종으로부터 채종한것을 시험재배에 리용하였다.

하밀참외의 싹틔우기 및 최적생장온도를 고려하여 박막온실에서 씨뿌리는 시기를 4월초로 정하고 5일 간격으로 씨붙임하였다.

모기르기와 옮겨심기, 가꾸기, 비료주기와 넌출다듬기, 수정과 수확에 이르기까지 전 재배과정은 선행연구자료[1－7]에 준하여 진행하였다.

결과 및 론의

하밀참외는 씨앗에 기름기가 많고 씨앗껍질이 단단하므로 씨앗처리를 하여 심어야 제대로 싹이 틀수 있다.

그러므로 우리는 씨앗의 기름기를 제거하기 위하여 0.1% 과망산칼리움처리를 진행하였는데 이때 씨앗담그는 시간은 5～6h, 온도는 25～32℃를 보장해주었을 때 싹이 잘 텄다.

씨앗껍질을 연화시키기 위하여 과망간산칼리움처리후 하밀참외의 씨앗을 변온 또는 더운물처리, 모래속에 파묻는 방법으로 싹트기시켰는데 그 결과는 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 모래속에 파묻어 싹틔우기하면 변온처리나 더운물처리하여 심

표 1. 몇가지 종자처리방법에 따르는 하밀참외의 싹트기특성

처리방법	싹트는 기간/d	싹튼률 /%	첫싹이 나온 일수/d	싹튼 기간 /d	싹크기 /cm	싹직경 /cm
변온처리	63	30	2～3	3～4	0.89	0.11
더운물처리	62	100	1～2	2～3	2.50	0.18
모래속묻기	70	58	1～2	4～5	0.61	0.21

시험장소 사리원, 조사날자 2018년 4월 7일

은것에 비하여 싹트는 기간이 1～2정도 늦어지고 싹크기도 작았지만 싹이 층하가 없이 고르로웠다. 무난방온실에서는 밤에 온도가 내려가는것을 고려하여 밤온도가 최소한 12℃정도 보장될 때 씨뿌리기하는것이 좋았다. 또한 싹틔울 때 온실의 온도는 20～30℃, 습도는 70%정도 보장해야 싹이 잘 텄으며 씨뿌린 다음 2～3일후에 물주기를 하는것이 좋았다.

하밀참외의 씨뿌림시기에 따르는 발육상특성은 표 2와 같다.

표 2. 하밀참외의 씨뿌림시기에 따르는 발육상특성

구분	씨뿌린 날자 /월.일.	첫 싹이 돋은 날자/월.일.	첫 본잎이 나온 날자/월.일.	모옮긴 날자/월.일.	첫 수꽃 핀 날자/월.일.	첫 암꽃 핀 날자/월.일.	첫 수확 날자/월.일.
시험구 1	4.9.	4.14.	4.19.	4.26.	5.23.	5.30.	7.16.
시험구 2	4.9.	4.13.	4.19.	4.26.	5.22.	5.30.	7.15.
시험구 3	4.14.	4.17.	4.23.	5.5	5.27.	6.5.	7.20.
시험구 4	4.14.	4.17.	4.23.	5.5.	5.27.	6.6.	7.19.

온실재배, 평당포기수 4포기, 시험장소 사리원, 시험년도 2018년

표 2에서 보는바와 같이 씨뿌림시기에 따라 하밀참외의 발육기간이 약간씩 차이나며 수확기도 늦어진다.

싹튼 다음 모가 헛자라지 않도록 고온과 다습을 피하는것이 중요한데 이를 위해서는 첫 본잎이 나오기직전부터 온도를 적당히 떨구어 낮 25～28℃, 밤 15～16℃를 보장하여야 한다. 모를 옮겨심기 전에는 온도를 적당히 낮추어 단련을 시켜야 이른봄 낮은온도피해를 막을수 있다.

씨뿌리기하여 18～23일정도 지나면 본잎이 2.5～3.0매 되는데 이때에 옮겨심는다.

심는 포기수는 평당 4～6포기, 포기사이거리는 40cm정도로 하며 심을 때에는 박막단지를 째고 모를 옮겨심은 다음 물을 충분히 주도록 하여야 한다. 대체로 17시이후에 옮겨심는것이 좋으며 심은 후 낮온도는 30℃, 밤온도는 20℃를 보장하도록 하여야 한다. 토양온도와 온실안의 온도차이는 7～8℃정도 되게 조절하며 옮겨심은 다음날 포기당 류안 5g, 류산동 3g을 골고루 파묻고 가금분 1 000배액을 주어 토양에 잦아든 다음 물을 준다.

옮겨심은 후에는 생장상태를 보아가면서 식물영양액을 분무하여 아지치기를 촉진시켜야 한다.

하밀참외는 원순을 언제 치고 몇개의 마디와 잎수를 보장하는가에 따라 포기생육과 소출이 크게 달라지므로 원순치는 시기에 따르는 포기특성을 조사하였다.(표 3)

모를 옮겨심고 28, 33, 38일 되는 때에 원순치기를 시작하여 40일동안 5일 간격으로 진행하였다.

표 3. 원순치는 시기에 따르는 포기특성

원순치는 시기(모옮긴 때로부터)/d	넌출길이 /cm	마디수 /개	줄기직경 /cm	잎수 /매	잎길이 /cm	잎너비 /cm
28	180～190	21	1.7～2.1	20～24	25～27	35～37
33	210～230	27	1.2～1.4	28～29	21～23	28～32
38	245～280	29	1.0～1.3	32～33	20～22	26～28

온실재배, 평당포기수 6포기, 시험장소 사리원, 시험년도 2018년

표 3에서 보는바와 같이 모를 옮겨 28～30일 되는 시기(20～21개의 마디와 20～24개의 잎)에 원순치기하였을 때 잎길이와 잎너비가 원순치기를 그보다 5～10일 늦게 한 시험구에 비하여 상대적으로 더 컸다. 그리고 식물체가 병에도 잘 걸리지 않았다. 이것은 원순치는 시기가 빠를수록 포기생육이 왕성해진다는것을 보여준다.

원순치는 시기에 따르는 소출특성을 조사한 결과는 표 4와 같다.

표 4. 원순치는 시기에 따르는 소출특성

원순치는 시기(모옮긴 때로부터)/d	열매수	개당 질량 /kg	정보당소출 /t	소출비률 /%
28	1	3.0～4.5	64.0	161
33	1	2.0～3.0	50.0	126
38	1	1.8～2.5	39.6	100

온실재배, 평당포기수 6포기, 시험장소 사리원, 시험년도 2018년

표 4에서 보는바와 같이 모를 옮겨 28일만에 원순치기하였을 때 열매개당 질량과 정보당소출이 가장 높았다. 순치기를 늦게 할수록 수확고가 떨어지는 경향성이 나타났다.

하밀참외는 어느 위치에 피는 암꽃을 수정시켜 열매를 다는가에 따라 크기와 당도가 차이나므로 우리는 수정위치에 따르는 소출특성을 조사하였다.(표 5)

표 5. 암꽃의 수정위치에 따르는 하밀참외의 소출특성

결넌출이 나오는 원넌출위치	9번째	10번째	11번째	12번째	13번째	14번째
열매수/개	1	1	1	1	1	1
결넌출의 수정마디	첫번째	첫번째	첫번째	첫번째	첫번째	첫번째
개당 질량/kg	3.0～3.6	2.6～3.3	2.4～3.0	2.1～2.8	2.0～2.5	1.4～1.8

온실재배, 평당포기수 6포기, 시험장소 사리원, 시험년도 2018년

표 5에서 보는바와 같이 결넌출의 첫번째 마디 첫 암꽃에 수정시킬 때 수정률이 높고 소출도 안전하였는데 원넌출에서 결넌출이 나오는 위치에 따라 개당 질량이 차이났다. 특히 9번째 마디의 결넌출에 열매가 달리게 하였을 때 열매의 질량이 제일 컸다.

또한 넌출에서 암꽃수정위치가 웃마디로 올라갈수록 아래마디에 수정시킨 열매보다 당도가 떨어졌다.

맺 는 말

1) 하밀참외는 씨앗에 기름기가 많으므로 0.1% 과망산칼리움처리를 진행해야 하는데 씨앗담그는 시간은 5～6h, 온도는 25～32℃를 보장해야 싹이 잘 튼다.

2) 하밀참외는 온실안의 최저온도가 8～10℃정도일 때 씨를 뿌려야 생육에 지장이 없으므로 파종시기를 잘 정해야 한다.

3) 하밀참외는 대체로 모를 옮겨서 28～30일 되였을 때 18～20마디를 내놓고 원순을 치는것이 합리적이다.

4) 9～14번째 마디에서 나오는 곁넌출 첫번째 마디의 첫 암꽃에 수정시킬 때 소출이 높았다.

참 고 문 헌

[1] 림광일 등; 채종학(대학용), 고등교육도서출판사, 103～106, 300～310, 주체105(2016).
[2] 리정호; 남새육종 및 채종학, 고등교육도서출판사, 109～113, 151～176, 주체96(2007).
[3] 안창건 등; 농업전서(육종편), 농업출판사, 251～263, 주체90(2001).
[4] 严秀琴 等; 中国西瓜甜瓜, 5, 23, 2004.
[5] 李良友; 中国瓜菜, 29, 1, 42, 2016.
[6] 戶金鸽 等; 中国瓜菜, 26, 4, 9, 2013.
[7] 戶金鸽 等; 中国瓜菜, 24, 3, 10, 2011.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

On the Rational Cultivation Technique of Hami.melon (*Cucumis melo* var. *saccharinus* Naud.)

Yun Kum Byol, *Ri Se Chan*

We researched on the technique for culturing of Hami.melon(*Cucumis melo* var. *saccharinus*) on the greenhouse condition in our country.

Seeds of Hami.melon have much oiliness, therefore must be treated with 0.1% of potassium permanganate at 25～32℃ for 5～6h.

Hami.melon dislikes hot and humid condition and has a weak resistance to cold. It is not the sowing period until the lowest temperature of greenhouse is 8～10℃, then there is no disturbance for growth. Cutting off sprouts must be done except of 18～20 nodes of main stem, when it goes 20～30 days since seedlings were transplanted to field, The harvest of Hami.melon increases when it is fertilized on 1st female flower of 1st node of offshoot in 9～14th node.

Key words: cultivation, Hami.melon, greenhouse

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

선물레나물에타놀추출물을 적용한 흰생쥐간장에서 몇가지 면역관련유전자들의 전사수준발현분석

박성철, 김대성

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현대과학기술의 빠른 발전은 기초과학의 성과에 토대하고있으며 과학기술분야에서의 자립성은 기초과학분야에서부터 시작됩니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제10권 485페지)

최근 선물레나물에 대한 연구가 심화되는 과정에 선물레나물에타놀추출물이 흰생쥐의 면역기능을 높인다는것이 밝혀졌다. 그러나 이러한 면역기능높임작용물림새를 면역관련유전자들의 전사수준에서 발현분석을 통하여 연구한 자료는 제기된것이 없다.

우리는 선물레나물에타놀추출물[1](HPE_{Et})을 적용한 흰생쥐의 간장을 리용하여 역전사PCR(RT-PCR)법으로 몇가지 면역관련유전자들(*IL-1*α, *IL-1*β, *IL-2*, *TNF-*α, *IFN-*γ)의 발현분석을 진행하였다.

재료와 방법

재료 몸질량이 20g정도인 흰생쥐를 리용하였다.

흰생쥐를 각각 10마리씩 대조무리와 시험무리로 나누고 대조무리에는 생리적식염수 0.5mL를, 시험무리에는 HPE_{Et}를 몸질량 1kg당 0.1g의 량으로 하루에 한번씩 15일동안 경구주입하였다. 또한 실험마감 4일전에 모든 실험무리들에 5% 양적혈구용액을 복강주사하여 면역시켰다. 5% 양적혈구용액을 주입하기 전(0일), 주입후 2일과 4일에 각각 흰생쥐에서 간장을 100mg씩 취하여 －80℃에서 동결보관하였다.

mRNA분리와 cDNA합성 －80℃에서 동결시킨 시료들을 리용하여 트리졸법으로 mRNA를 분리하였다. 분리한 mRNA의 순도는 자외선흡광광도계(《UV-2450 shimdin》)로 흡수파장 260, 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 두오리사슬cDNA는 cDNA합성시약키트(Takara M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit)를 리용하여 합성하였다.[4]

면역관련유전자들의 프라이머설계 대조유전자로서 흰생쥐의 모든 조직에서 같은 량으로 발현되는 *GAPDH*(글리세르알데히드트리린산데히드로게나제)유전자를 리용하였다. 대조유전자 *GAPDH*를 포함한 면역관련유전자들의 염기배렬은 국제유전자은행자료기지(NCBI)에서 검색하여 얻었다. 실험에서 리용한 흰생쥐의 면역관련유전자들의 프라이머는 프라이머설계프로그람 《Primer Premier 5》로 설계하였다. 면역관련유전자무리들의 유전자발현검증에 리용된 프라이머배렬과 PCR조건은 표 1과 같다.

RT-PCR분석 선행방법[3]에 준하여 대부분 PCR산물들은 아닐링온도 50～55℃, 순환수 27～30회에서 얻었다.(표 1) RT-PCR산물은 1.2% 아가로즈겔전기영동을 진행하여 비교하였다.

표 1. 면역관련유전자발현검증에 리용된 프라이머배렬과 PCR조건

흰생쥐유전자 (EST)	프라이머 이름	프라이머배렬(5′－3′)	PCR산물의 크기/bp	PCR조건 (아닐링온도, 순환수)
GAPDH	C-F C-R	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG GTTGTCATGGATGACCTTGGCC	495	55°C, 30회
TNF-α	TNF*α*-F TNF*α*-R	CAGCCTCTTCTCATTCCTGCTTG GTCTTTGAGATCCATGCCGTTG	325	55°C, 28회
IL-1α	Il*α*-F Il*α*-R	CTCTGAATCAGAAATCCTTC TAGGCTACATGTCAAATTT	436	50°C, 28회
IL-1β	Il*β*-F Il*β*-R	AAAAGATGAAGGGCTGCTTCCA CATGGACAATATCACTTGTTGG	398	50°C, 28회
IFN-γ	IFN*γ*-F IFN*γ*-R	GAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACT ATCAGCAGCGACTCCTTTTCCGCTT	388	50°C, 28회
IL-2	IL2-F IL2-R	AACAGCGCACCCACTTCAA TTGAGATGATGCTTTGACA	442	55°C, 27회

결과 및 론의

흰생쥐의 간장에서 mRNA분리 흰생쥐의 간장에서 mRNA를 분리하여 그 농도를 결정하였다.(표 2)

표 2에서 보는바와 같이 모든 시료에서 mRNA가 정확히 분리되였을뿐아니라 A_{260}/A_{280}값이 1.78～2.03사이에 있으므로 비교적 순도가 높다는것을 알수 있다. 일반적으로 A_{260}/A_{280}값이 1.8이하이면 단백질이 남아있다는것이고 2.0이상이면 RNA가 분해되였다는것을 보여준다.

표 2. 흰생쥐의 간장에서 분리해낸 mRNA의 농도

양적혈구주입 후 경과날자/d	구분	mRNA농도 /(ng·μL^{-1})	A_{260}/A_{280}
0	대조구	1 343.9	1.83
	시험구	1 578.3	2.03
2	대조구	1 148.2	1.99
	시험구	1 975.7	1.92
4	대조구	2 541.8	1.78
	시험구	2 271.6	1.96

프라이머설계의 정확성확인 흰생쥐에서 면역과정에 참가하는 몇가지 유전자들인 *TNF-α, IL-1α, IL-1β, IFN-γ, IL-2*와 *GAPDH*대조유전자의 염기배렬을 찾은 후 RT-PCR를 위한 프라이머를 설계하였다.(표 1) 설계된 프라이머와 시험무리 흰생쥐의 간장시료를 리용한 PCR를 진행하여 프라이머설계의 정확성을 확인하였다.(그림 1)

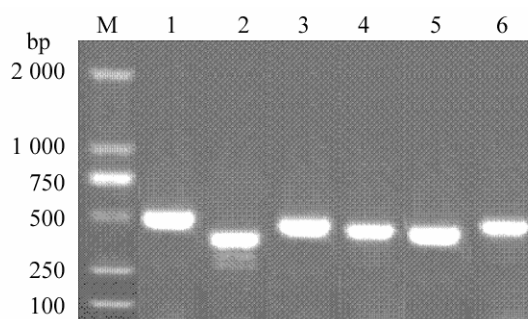


그림 1. PCR에 의한 목적DNA단편들의 전기영동상
M은 100bp DNA크기표식자(《TAKARA》),
1－*GAPDH*(495bp), 2－*TNF-α*(325bp),
3－*IL-1α*(436bp), 4－*IL-1β*(398bp),
5－*IFN-γ*(388bp), 6－*IL-2*(442bp)

그림 1에서 보는바와 같이 대조유전자 *GAPDH*는 495bp, *TNF-α*유전자는 325bp, *IL-1α*유전자는 436bp, *IL-1β*유전자는 398bp, *IFN-γ*유전자는 388bp, *IL-2*유전자는 442bp근방의 크기를 가졌다.

이로부터 우리는 면역관련유전자무리들의

프라이머가 정확히 설계되였다고 인정하였다.

면역관련유전자무리들의 RT-PCR결과 HPE_{Et}적용후 흰생쥐의 간장조직에 들어있는 면역관련유전자무리들의 RT-PCR분석을 진행하였다.(그림 2)

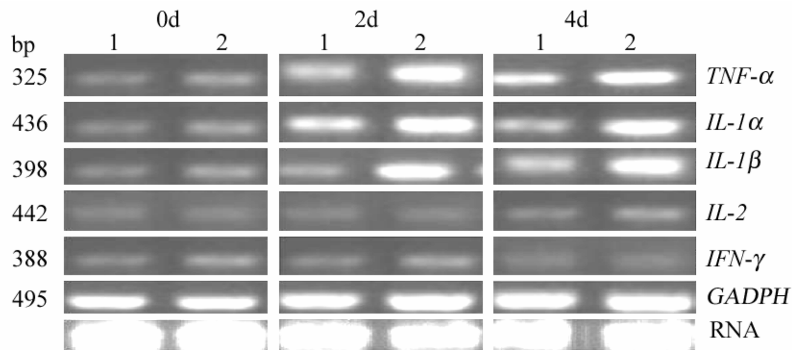


그림 2. HPE_{Et}적용후 흰생쥐의 간장조직에서 면역관련 유전자무리들의 RT-PCR전기영동상
1－대조, 2－시험

그림 2에서 보는바와 같이 흰생쥐의 간장조직에서 대조유전자 *GAPDH*의 발현은 대조무리와 시험무리에서 차이가 없이 나타났지만 면역과정에 참가하는 몇가지 유전자들의 발현에서는 변화가 있었다. 특히 *TNF-α*유전자는 0일에는 전사수준에서 유전자발현량이 적었지만 2일부터는 대조무리와 시험무리에서 차이가 있었다. 2일에 *TNF-α*유전자의 발현은 대조무리에서 0일의 발현수준보다 약간 높아지고 시험무리에서도 유전자발현량이 현저하게 높아졌다. 4일에는 2일에 비하여 대조무리와 시험무리에서 유전자의 발현수준차이가 없었다. 우리가 연구한 유전자들가운데서 *TNF-α*유전자의 발현변화가 제일 뚜렷하였다.

다음으로 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자는 다 같이 0일에는 전사수준에서 유전자발현량이 매우 적었지만 2일부터는 대조구와 시험구에서 차이가 나타났다. 2일과 4일에 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자의 발현은 대조에서 0일의 발현수준보다 약간 높아지고 시험구에서도 유전자발현량이 약간 높아졌다. 4일에 *IL-1α*와 *IL-1β*유전자의 발현은 2일에 비하여 차이가 없었다. *IL-1α*와 *IL-1β* 유전자는 *TNF-α*유전자 다음으로 그 발현변화가 뚜렷하였다.

이러한 실험결과들은 선물레나물알콜추출물에 의하여 쿠페르세포(간장대탐식구)가 활성화되였다는것을 의미한다.

조사된 유전자들가운데서 *IL-2*와 *IFN-γ*유전자는 0일에는 대조와 시험구에서 다 같이 전사수준에서 유전자발현량이 적었고 2일과 4일에도 대조와 시험구에서 발현증가가 명백히 나타나지 않았다. *IFN-γ*의 발현이 대조와 차이가 없으므로 T세포에 의한 대탐식구의 활성화[2]가 아니라 선물레나물알콜추출물의 작용으로 대탐식구활성화가 강화된것으로 볼수 있다.

맺 는 말

HPE_{Et}는 흰생쥐의 쿠페르세포의 *TNF-α*와 *IL-1α*, *IL-1β*유전자발현수준을 높여 활성화에 직접적인 영향을 미친다.

참 고 문 헌

[1] 김일성종합대학학보 생명과학, 65, 2, 3, 주체108(2019).
[2] Yutaka Furukawa et al.; Jpn. Circul. J., 10, 775, 1999.
[3] Tsunetake Motai et al.; Chem. Pharm. Bull., 61, 6, 618, 2013.
[4] Kazunori Hamamura et al.; Cellular Signalling, 27, 828, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Expression Analysis in the Transcription Level of Some Immune-Related Genes in the Liver of Mice Taken with Ethanol Extract of *Hypericum perforatum*

Pak Song Chol, Kim Tae Song

Ethanol extract(HPE_{Et}) of *Hypericum perforatum*, increasing expression of *TNF-*α, *IL-1*α and *IL-1*β genes in the Kupffer's cells within mice liver, influences directly on the activation of the Kupffer's cells.

Key words: *Hypericum perforatum*, immune-related genes, Kupffer's cells

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

CRISPR/Cas9기술로 벼의 천알질량관련유전자 *OsTGW6*속에 질산염수송체유전자 *OsNRT2.3b*를 표적특이적으로 삽입시키기 위한 운반체의 제작

한금성, 유웅주, 허명식

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학을 비롯한 핵심기초기술과 새 재료기술, 새 에네르기기술, 우주기술, 핵기술과 같은 중심적이고 견인력이 강한 과학기술분야를 주타격방향으로 정하고 힘을 집중하여야 합니다.》

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9에 기초한 게놈편집기술은 오늘 생명과학에서 최첨단기술로서 이미 새로운 벼품종의 육종에 널리 도입되여 적지 않은 성과들이 이룩되였다.[5, 7, 9] 여러개의 gRNA를 동시에 발현시켜 게놈편집효률을 높이고 벼의 천알질량관련유전자(*OsTGW6*)를 파괴할 때 벼의 수확고가 높아졌다는 연구결과가 발표[3, 10]되였다.

우리는 이 기술을 리용하여 벼의 천알질량관련유전자(*OsTGW6*)를 파괴하면서 그속에 벼의 질산염수송체유전자 *OsNRT.2.3b*를 표적특이적으로 삽입시키고 과잉발현시키기 위하여 Golden Gate법으로 *OsTGW6*에 대한 2개의 한오리안내RNA(sgRNA)가 발현되며 35S프로모터(P_{35S})와 T_{nos}사이에 *OsNRT2.3b*가 놓이고 그 량쪽에 *OsTGW6*의 상동팔을 각각 가진 운반체를 제작하였다.

재료와 방법

운반체로는 벼의 CRISPR/Cas9발현운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H를, 숙주로는 *Escherichia coli* Top10을 리용하였다.

《평양 53》호의 *OsNRT2.3b*를 클론화하기 위한 nested PCR의 프라이머와 2개의 엑손을 클론화하기 위한 프라이머는 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배렬자료에 기초하여 설계하였다. 그리고 *OsNRT2.3b*를 발현시키기 위한 프로모터(P_{35S})와 터미네터(T_{nos})는 식물발현운반체 pCAMBIA1301를 주형으로 PCR로 증폭하여 리용하였다. 그리고 상동재조합에 의하여 *OsTGW6*속에 표적특이적으로 삽입시키기 위한 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔은 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배렬자료와 GenBank AB513135의 자료에 기초하여 *OsTGW6*에 대한 2개의 sgRNA배렬의 량쪽 400bp배렬을 그에 해당한 프라이머로 먼저 nested PCR를 진행하고 다음 량쪽 팔을 각각 PCR로 증폭하여 클론화하였다. 이렇게 얻어진 오른쪽 상동팔과 P_{35S}, *OsNRT2.3b*의 엑손 1과 엑손 2, T_{nos}, 왼쪽 상동팔에는 모두 Golden Gate법으로 련결하기 위한 제한효소 *Bsa*I의 인식배렬이 들어있도록 프라이머들을 설계하고 리용하였다.

모든 프라이머들을 전문기관에 의뢰하여 합성하였다. 그리고 모든 PCR반응과 플라즈미드들의 분리정제와 형질전환, Golden Gate반응은 선행방법[1, 2, 6]에 따라 진행하였다.

결과 및 론의

1）*OsNRT2.3b*를 클론화하기 위한 nested PCR

*OsNRT2.3*은 1번 염색체에 놓여있으며 길이가 서로 다른 전사산물로서 OsNRT2.3a (AK109776)와 OsNRT2.3b(AK072215)가 생긴다. *OsNRT2.3*은 2개의 엑손과 1개의 인트론으로 되여있는데 이것이 하나의 CDS로 발현되면 OsNRT2.3a(516개 아미노산)가 생기고 잘라잇기에 의하여 인트론이 떨어져나가면 2개의 엑손만으로 된 OsNRT2.3b(486개의 아미노산)가 생긴다. OsNRT2.3b는 질산염수송체로서 그 유전자는 끌관속에서 발현되면서 pH수감모티브가 세포질쪽에 놓여 식물체전반의 pH항상성을 보장하고 질산염의 흡수와 수송을 촉진하여 벼의 수확고에 큰 영향을 미친다.[8]

*OsNRT2.3b*의 엑손 1과 2를 클론화하기 위하여 먼저 nested PCR로 이 유전자를 통채로 PCR증폭하였다. 클론화를 위하여 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배렬자료에 기초하여 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

FP: 5′–GAGCCGCGCTTTCCGCTAT–3′

RP: 5′–CTGTTCCCAGCGAATCAACGACT–3′

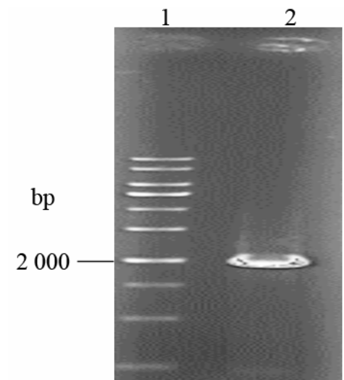


그림 1.《평양 53》호벼에서 게놈DNA를 분리하고 nested PCR한 아가로즈겔전기영동상
1－분자크기표식자(DNA Ladder 1000), 2－《평양 53》호의 게놈DNA에 대한 nested PCR산물

《평양 53》호의 게놈DNA를 CTAB법으로 분리정제하고 우의 프라이머로 nested PCR를 진행한 결과 *OsNRT2.3*을 포함한 PCR산물의 크기는 2 026bp로서 예상위치에서 단일띠로 나타났다.(그림 1) 그러므로 우리가 목적하는 *OsNRT2.3*을 포함하는 PCR산물이 정확히 얻어졌다는것을 알수 있다.

2）*OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2의 클론화

*OsNRT2.3*에 대한 nested PCR산물로부터 그속에 있는 인트론을 제외하고 2개의 엑손으로만 된 CDS를 만들기 위하여 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2를 각각 클론화하기로 하였다.

*OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2를 클론화하기 위한 프라이머를 *Oryza sativa* 조선형벼의 게놈배렬자료에 기초하여 다음과 같이 설계하였다.

엑손 1

FP: 5′–AGC*ggtctc**c***CTTGCTACCACGTGTTG–3′

RP: 5′–GC*ggtctc**g***CGGCGAACGTGGACA–3′

엑손 2

FP: 5′–GT*ggtctc**c***GCCGTGTTCG–3′

RP: 5′–GT*ggtctc**a***TTGCGACCTTATTGTCC–3′

*OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 한 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 우의 프라이머들을 리용하여 *OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 PCR를 진행한 결과 크기가 232bp인 *OsNRT2.3b*의 엑손 1에 해당한 띠와 크기가 1 318bp인 *OsNRT2.3b*의 엑손 2에 해당한 띠가 정확히 얻어졌다.

3) P_{35S}와 T_{nos}의 PCR클론화

*OsNRT2.3b*를 잘 알려진 P_{35S}와 T_{nos}를 리용하여 과잉발현시키기 위하여 그것에 해당한 DNA배렬을 식물발현운반체인 pCAMBIA1301로부터 PCR법으로 얻기로 하였다. 먼저 플라즈미드 pCAMBIA1301의 배렬자료에 기초하여 프라이머를 다음과 같이 설계하였다.

P_{35S}에 해당한 프라이머

FP: 5′–TC*ggtctc**t***AGAATCCCGCCTTCAGTTTAGC–3′

RP: 5′–TA*ggtctc**t***CAAGAGTCCCCCGTGTT–3′

T_{nos}에 해당한 프라이머

FP: 5′–AA*ggtctc**g***GCAATAAAGTTTCTTAAGAT–3′

RP: 5′–AA*ggtctc**a***AGGTTTAATTCCCGATCTAGTA–3′

다음 이 프라이머들을 리용하여 플라즈미드 pCAMBIA1301의 DNA를 주형으로 PCR를 진행하였을 때 목적하는 579bp의 P_{35S}와 267bp의 T_{nos}의 DNA배렬이 정확히 증폭되였다.(그림 3)

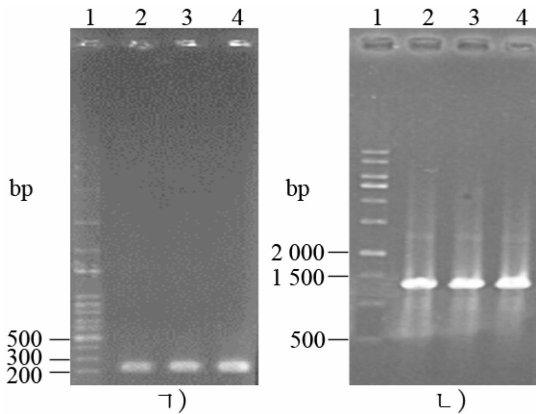


그림 2. *OsNRT2.3*의 nested PCR산물을 주형으로 한 *OsNRT2.3*의 엑손 1과 엑손 2에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상

ㄱ) 엑손 1에 대한 PCR산물: 1－분자크기표식자(DNA Ladder 100), 2－4는 엑손 1의 PCR산물; ㄴ) 엑손 2에 대한 PCR산물, 1－분자크기표식자(DNA Ladder 1000), 2－4는 엑손 2의 PCR산물

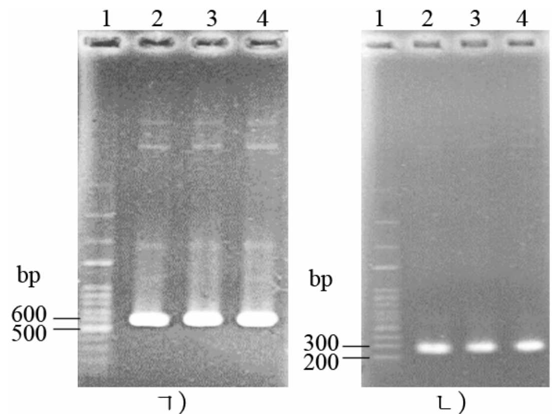


그림 3. P_{35S}와 Tnos배렬에 대한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상

ㄱ) P_{35S}배렬에 대한 PCR산물: 1－DNA표식자(DNA Ladder 100), 2－4는 P_{35S}배렬에 대한 PCR산물; ㄴ) Tnos배렬에 대한 PCR산물: 1－DNA표식자(DNA Ladder 100), 2－4는 T_{nos}배렬에 대한 PCR산물

4) *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 삽입하기 위한 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔에 해당한 DNA단편의 PCR클론화

CRISPR/Cas9기술에서는 게놈의 목적하는 부위에 DSB를 도입하면 재조합률이 비약적으로 높아지는데 상동단편이 있으면 상동재조합에 의하여 상동단편이 그 부위에 치환되여 목적하는 DNA단편이 정확히 표적특이적으로 삽입된다. 우리는 *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 표적특이적으로 삽입시키기 위하여 *OsTGW6*을 파괴하기 위한 sgRNA1과 sgRNA2에 대하여 량쪽으로 각각 400bp의 상동팔DNA단편을 클론화하기로 하였다. 먼저 *OsTGW6*를 nested PCR로 증폭하기 위한 프라이머를 설계하고 PCR를 진행하였다.(그림 4)

FP: 5′–CAAACTGGTTATTGAGCCTGTGC–3′

RP: 5′–TGGGTCGCCATCGGTTC–3′

그림 4에서 보는바와 같이 4 219bp의 *OsTGW6*를 포함하는 DNA단편이 정확히 얻어졌다.

다음 이 DNA단편을 주형으로 하여 오른쪽 상동팔과 왼쪽 상동팔을 PCR증폭하기 위한 프라이머를 다음과 같이 설계하고 PCR를 진행하였다.(그림 5)

오른쪽 상동팔을 얻어내기 위한 프라이머

FP: 5′–AG*ggtctc**g***ACCTCGGCGGATCACTG–3′

RP: 5′–GATCGTTGGTAGTTCATGCTGCTGTCG–3′

왼쪽 상동팔을 얻어내기 위한 프라이머

FP: 5′–AACAGTCCATTATCATCTGGCCTGTCA–3′

RP: 5′–TC*ggtctc**c***TTCTCATGGCTGTAGCCTGTAG–3′

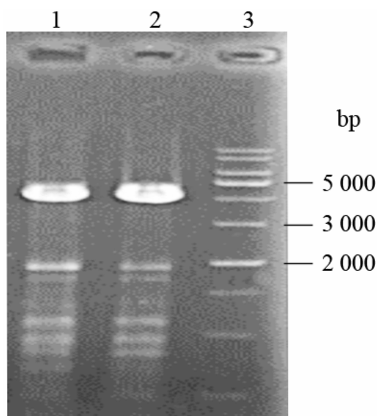


그림 4. *OsTGW6*에 대한 nested PCR산물의 아가로즈겔 전기영동상

1, 2는 각각 nested PCR산물, 3－DNA크기표식자(DNA Ladder 1000)

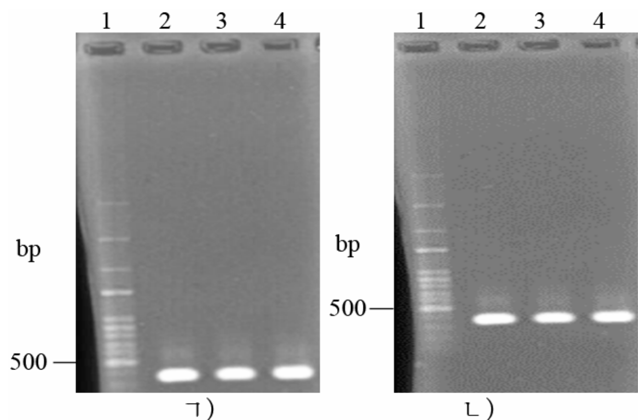


그림 5. *OsTGW6*에서 왼쪽 상동팔과 오른쪽 상동팔을 얻어내기 위한 PCR산물의 아가로즈겔전기영동상

ㄱ) 왼쪽 상동팔의 DNA단편에 대한 PCR산물: 1－DNA크기표식자(DNA Ladder 100), 2－4는 PCR산물; ㄴ) 오른쪽 상동팔의 DNA단편에 대한 PCR산물: 1－DNA크기표식자(DNA Ladder 100), 2－4는 PCR산물

그림 5에서 보는바와 같이 우에서 설계한 프라이머들을 리용하고 nested PCR산물을 주형으로 하여 PCR를 진행하였을 때 362bp의 왼쪽 상동팔과 429bp의 오른쪽 상동팔에 해당한 DNA단편이 정확히 증폭되였다.

5) *OsNRT2.3b*삽입－발현카세트의 제작

우에서 합성된 *OsTGW6*에 대한 오른쪽 상동팔과 P_{35S}, *OsNRT2.3b*의 엑손 1과 엑손 2, T_{nos}, 왼쪽 상동팔에 해당한 DNA단편들을 Golden Gate법으로 하나로 련결하여 *OsNRT2.3b*삽입－과잉발현카세트를 만들기로 하였다. 매 DNA단편들에 대한 프라이머들을 설계할 때 Golden Gate법으로 련결하기 위한 제한효소 *Bsa*I의 제한효소인식부위를 고려하였으므로 이 6개의 DNA단편들을 Golden Gate법으로 련결하고 프라이머

FP: 5′–AG*ggtctc**g***ACCTCGGCGGATCACTG–3′

RP: 5′–TC*ggtctc**c***TTCTCATGGCTGTAGCCTGTAG–3′

를 리용하여 PCR증폭을 진행하였다.(그림 6)

그림 6에서 보는바와 같이 6개의 DNA단편들이 모두 하나로 합쳐져 결국 3 083bp의 DNA단편이 정확히 자기 위치에서 나타났다. 따라서 목적하는 *OsTGW6*에 대한 오른쪽 상동팔+P_{35S}+*OsNRT2.3* 엑손 1+엑손 2+T_{nos}+왼쪽 상동팔로 된 하나의 DNA단편 즉 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트가 만들어졌다는것을 알수 있다.

6) *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트의 련결

《평양 53》호의 *OsNRT2.3b*를 *OsTGW6*속에 게놈편집기술로 표적특이적으로 삽입시켜 과잉발현시키기 위하여 2중sgRNA발현카세트[1]와 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트를 Golden Gate법으로 련결하고 해당한 프라이머로 PCR를 진행하였다.(그림 7)

련결산물을 얻기 위해 리용한 프라이머는 다음과 같다.

FP: 5′–TGTAAAACGACGGCCAGT–3′

RP: 5′–CAGGAAACAGCTATGACC–3′

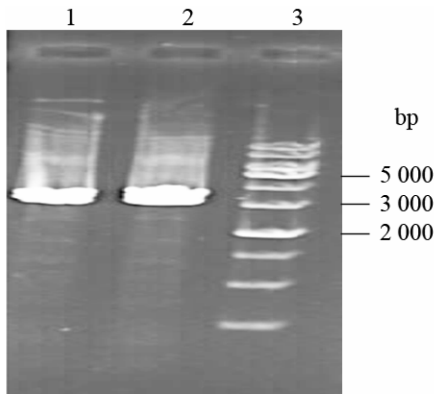


그림 6. *OsTGW6*왼쪽 상동팔+P_{35S}+ +*OsNRT2.3*엑손 1+엑손 2+T_{nos}+ +*OsTGW6*오른쪽 상동팔로 된 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트에 대한 PCR산물의 아가로즈겔 전기영동상

1, 2는 각각 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트에 대한 PCR산물, 3−DNA크기표식자 (DNA Ladder 1000)

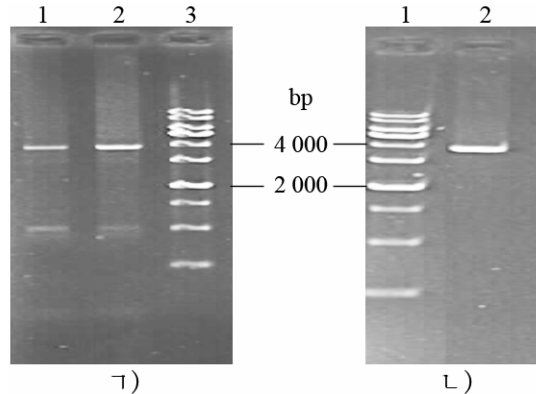


그림 7. Golden Gate법으로 련결된 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트에 대한 PCR산물과 겔분취단편의 아가로즈겔 전기영동상

ㄱ) PCR산물: 1,. 2는 PCR산물, 3−DNA크기표식자 (DNA Ladder 1000); ㄴ) 아가로즈겔분취단편: 1−DNA크기표식자(DNA Ladder 1000), 2−겔분취단편

그림 7에서 보는바와 같이 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트를 Golden Gate법으로 련결하고 PCR를 진행하였을 때 3 918bp의 예상띠가 자기 위치에 정확히 나타났다.(그림 7의 ㄱ)) 한편 PCR과정에 일부 부산물띠들이 나타났으므로 목적하는 단편만을 아가로즈겔분취하여 전기영동하였을 때 정확히 자기의 띠가 나타났다.(그림 7의 ㄴ))

7) 2중sgRNA발현카세트+*OsNRT2.3b*삽입−발현카세트의 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H운반체에로의 클론화

최종적으로 식물의 CRISPR운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입−발현카세트를 클론화하였다. 그것을 위하여 먼저 우의 3 918bp의 배렬을 우의 프라이머로 PCR증폭하고 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H의 플라즈미드DNA와 함께 Golden Gate반응을 진행한 다음 *E. coli* Top10에 형질전환시켜 형질전환체들을 얻었다. 얻

어진 이 형질전환체들에 대하여 선행연구[4]에 제시된 SP-L1과 SP-R프라이머로 균무지PCR를 진행하고 양성균무지들로부터 플라즈미드를 분리하여 다시 PCR를 진행한 다음 목적하는 재조합플라즈미드를 가진 균무지들을 선발하였다.(그림 8)

재조합플라즈미드를 가진 균무지선발에 리용한 프라이머는 다음과 같다.

SP-L1: 5′–GCGGTGTCATCTATGTTACTAG–3′

SP-R: 5′–CGACATAGATGCAATAACTTCG–3′

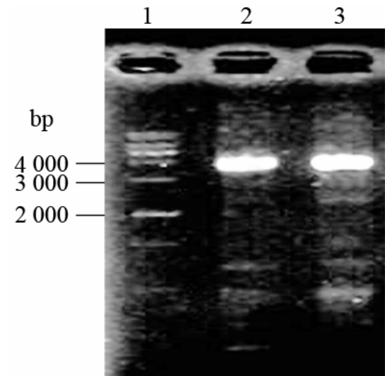


그림 8. 형질전환체확인을 위한 PCR산물의 전기영동상
1—DNA크기표식자(DNA Ladder 1000), 2—균무지PCR결과, 3—형질전환체로부터 분리한 플라즈미드를 주형으로 진행한 PCR산물

그림 8에서 보는바와 같이 형질전환체에서 분리한 플라즈미드를 주형으로 하고 우의 프라이머를 리용하여 PCR를 진행한 결과 4 054bp의 예상띠가 정확한 위치에 나타났다.

이렇게 만든 *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입—발현카세트가 클론화된 재조합플라즈미드를 pYLCRISPR/Cas9-TGW6:2sgRNAs-NRT2.3b라고 하였으며 그것의 물리적지도는 그림 9와 같다.

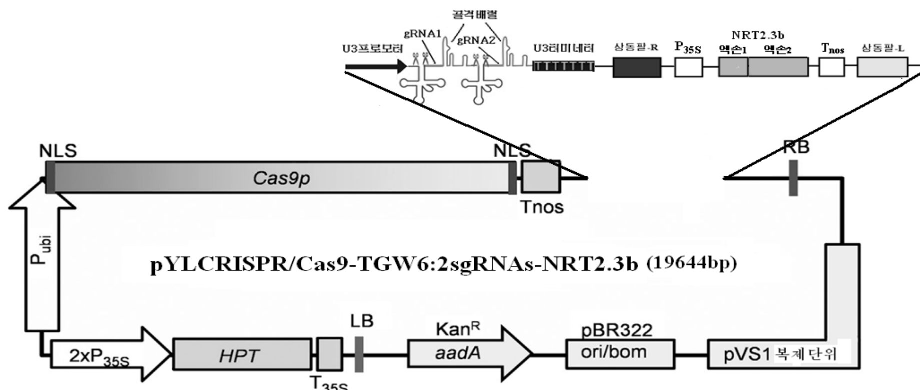


그림 9. 재조합플라즈미드 pYLCRISPR/Cas9-TGW6:2sgRNAs-NRT2.3b의 물리적지도

맺 는 말

1) 우리 나라의 벼품종 《평양 53》호로부터 nested PCR로 *OsNRT2.3*을 얻은 다음 PCR로 엑손 1과 엑손 2에 해당한 DNA단편을 얻어냈다.

2) 우리 나라의 벼품종 《평양 53》호로부터 nested PCR로 *OsTGW6*을 얻은 다음 PCR로 왼쪽 상동팔과 오른쪽 상동팔에 해당한 DNA단편을 얻어냈다.

3) pCAMBIA1301로부터 PCR로 P_{35S}와 T_{nos}를 얻어냈다.

4) 우에서 얻은 6개의 단편들을 Golden Gate법으로 하나로 련결하고 PCR를 진행하여 *OsNRT2.3b*삽입—파잉발현카세트를 얻어냈다.

5) *OsTGW6*에 대한 2중sgRNA발현카세트와 *OsNRT2.3b*삽입—발현카세트가 련결된 3 918bp의 단편을 식물운반체인 pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H에 Golden Gate법으로 클론화하였다.

참 고 문 헌

[1] **김일성**종합대학학보 생명과학, 64, 2, 71, 주체107(2018).
[2] C. Engler et al.; PLoS ONE, 3, 11, 2008.
[3] K. Xie et al.; PNAS, 112, 11, 3570, 2015.
[4] X. Ma et al.; Mol. Plant, 8, 1274, 2015.
[5] R. Xu et al.; J. Genetics and Genomics, 43, 529, 2016.
[6] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 201～387, 2001
[7] A. V. Wright et al.; Cell, 164, 29, 2016.
[8] X. Fan et al.; PNAS, 113, 26, 7118, 2016.
[9] H. Puchta et al.; Current Opinion in Plant Biology, 36, 1, 2017.
[10] 王加峰 等; 作物学报, 42, 1160, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Construction of a Plasmid Vector for Targeted Homology-Dependent Knock-in of Nitrate Transporter Gene, *OsNRT2.3b* into Thousand Grain Weight Gene, *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 System

Han Kum Song, Yu Ung Ju and *Ho Myong Sik*

We report the construction of a plasmid vector for homology-dependent knock-in of nitrate transporter gene, *OsNRT2.3b* into thousand grain weight gene, *OsTGW6* by CRISPR/Cas9 system. We sequenced the appropriate regions of *OsNRT2.3* and *OsTGW6* from elite cultivar, “Pyongyang No. 53”, and obtained DNA fragments of exon 1 and exon 2 from *OsNRT2.3b*, and left homology arm and right homology arm from *OsTGW6* with nested PCR, followed by cloning CaMV 35S promoter(P_{35S}) and terminator, T_{nos} from plasmid pCAMBIA1301 by PCR. And then above six DNA fragments of left homology arm from *OsTGW6*, P_{35S}, exon 1 and exon 2 from *OsNRT2.3b*, T_{nos}, and right homology arm from *OsTGW6* were assembled by using Golden Gate method, giving rise to *NRT2.3b* knockin-overexpressing cassette, which was linked to *OsTGW6*-targeted dual single guide RNAs(sgRNAs)-expressing cassette based on the tRNA processing system and rice U3 promoter-terminator using Golden Gate method, that was cloned into crop CRISPR/Cas9 vector, pYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H and was given their entity.

Key words: CRISPR/Cas9, rice, “Pyongyang No. 53”, *OsTGW6*, *OsNRT2.3b*, homology-dependent knock-in, Golden Gate method

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제1호

사람글루카곤양펩티드－1(GLP-1)유전자를 발현하는 대장균그루를 제작하기 위한 연구

리진철, 강영수, 장명철, 김봉혁

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《첨단과학기술분야에서 세계적경쟁력을 가진 기술들을 개발하기 위한 투쟁을 힘있게 벌려야 합니다.》

당뇨병은 암, 심장혈관질병과 함께 3대 비전염성질병으로 되고있으며 세계적으로 환자수는 2억명이상에 달하고있다. 당뇨병은 장기적인 치료를 동반하는 난치성질병이며 그중 90%이상은 Ⅱ형당뇨병(인슐린에 의존하지 않는 당뇨병)이다. 이로부터 우리는 Ⅱ형당뇨병의 치료에서 세계적으로 가장 주목되고있는 글루카곤양펩티드－1(GLP-1)[1]을 개발하는데서 첫 단계인 유전자발현균그루를 만들기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

균그루 클론화균그루 *E. coli* DH5α(supE44, △lacU169(Φ80lacZ△M15), HsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1)와 발현균그루 *E. coli* BL21(DE3)(F^-, ompT, hsdS_B($r_B{}^-$ $m_B{}^-$), dcm, gal(DE3))를 썼다.

운반체[2] 클론화운반체 pUC57(2 710bp)와 발현운반체 pET24b(+)(5 309bp)를 리용하였다.

효소 및 시약 효소로는 제한효소 *Nde* I, *Xho* I(《Promega》)을, T4DNA리가제, *Taq*DNA폴리메라제를 썼으며 PCR키트, 분자크기표식자 DL 2000(《TaKaRa》), DNA 100bp Ladder(《MBI Fermentas》), λDNA/*Eco*14TI digest(《Sangon》), DMSO, PEG 3350(《Sangon》), 페놀, 클로로포름, NaOH, EtBr, 아가로즈 등과 같은 시약들을 리용하였다.

대장균배양배지[3] LB배지(펩톤 1%, 효모엑스 0.5%, 소금 0.5%, 포도당 1%, pH 7.0), 무기염배지(R/2배지: KH_2PO_4 6.75g, $(NH_4)_2HPO_4$ 2g, 레몬산 0.85g, 포도당 10g, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.75g, 미량원소액 1mL, pH 7.0), 첨가배지(100mL당 포도당 40g, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 2g, 효모엑스 2g, 카자미노산 1g, pH 7.0)를 리용하였다.

미량원소액의 조성은 다음과 같다.

1L당 $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 40mg, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$ 40mg, $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$ 2mg, $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ 2mg, $MnSO_4{\cdot}H_2O$ 10mg, $AlCl_3{\cdot}6H_2O$ 10mg, $CuCl_2{\cdot}2H_2O$ 1mg, $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ 4mg, H_3BO_3 0.5mg

방법 플라즈미드DNA분리, 제한효소반응, 리가제반응, 감수태세포의 제조, 형질전환체의 선발, 아가로즈겔전기영동, 대장균의 형질전환 등 DNA조작과 관련한 모든 실험은 선행방법[2, 3]에 준하여 진행하였다.

재조합대장균의 배양과 유전자발현검토는 선행방법[1]에 준하여 진행하였다.

결과 및 고찰

1) 주형DNA배렬과 프라이머의 합성

설계한 DNA배렬(357bp)은 다음과 같다.

ATACAT**ATG**CGCCACGGTGAAGGTACCTTCACCAGCGACGTTAGCAGCTACCTGGAAGAACAGGCTG
CTCAGGAATTCATCGCTTGGCTGGTTAAACATGGCGAGGGCACTTTTACTTCTGATGTATCGTCGTA
TCTTGAGGAGCAAGCAGCACAAGAGTTTATTGCATGGCTCGTAAAGCACGGGGAAGGGACGTTCACG
AGTGACGTGAGTAGTTACTTGGAAGAACAGGCGGCGCAGGAATTCATAGCGTGGTTGGTGAAACATG
GAGAGGGAACATTTACATCAGATGTCTCATCATATTTAGAGGAGCAAGCCGCCCAAGAGTTTATCGC
CTGGTTAGTCAAGCTCGAGCGC

밑줄친 부분과 점선친 부분은 각각 1개의 GLP-1펩티드를 암호화한다.

우리는 DNA배렬의 설계에서 저분자펩티드의 발현을 높이기 위해 4량체의 융합단백질로 설계하였으며 전사단계의 호상간섭(머리핀구조의 형성 등)을 피하기 위하여 매 반복배렬에서 비반복적인 코돈들을 대응시켰다. 또한 발현된 융합단백질에서 개별적인 GLP-1펩티드를 효소분해방법으로 얻기 위하여 매 반복배렬의 말단에 효소(트립신)의 절단위치에 해당한 아미노산(Lys 또는 Arg)을 배치하고 배렬내부의 효소절단점들을 다른 아미노산의 코돈들로 치환시켰다. 다음으로 이 DNA배렬을 플라즈미드 pET24b의 *Nde* I, *Xho* I위치에 삽입하기 위한 제한효소인식부위들을 5´, 3´말단에 각각 달아주었다.

주형DNA배렬을 증폭하기 위한 프라이머는 다음과 같이 설계하였다.

상류: ATACATATGCGCCACGGTG　누클레오티드개수 19, T_m 51.7℃

하류: GCGCTCGAGCTTGACTAAC　누클레오티드개수 19, T_m 50.2℃

2) 재조합발현운반체의 제작

먼저 클론화운반체 pUC57-GLP1로부터 GLP-1유전자단편을 증폭하기 위하여 우에서 설계한 프라이머를 가지고 PCR증폭을 진행하였다.(그림 1)

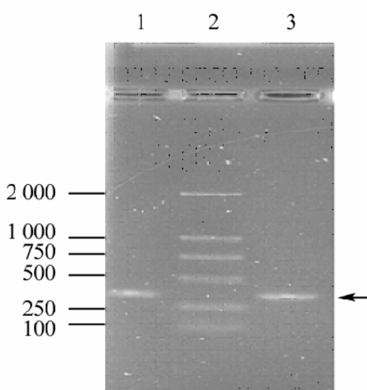


그림 1. GLP-1 4량체유전자의 PCR증폭 산물을 확인하기 위한 1% 아가로즈겔전기영동상
1, 3은 PCR산물, 2－분자크기표식자(DL2000)

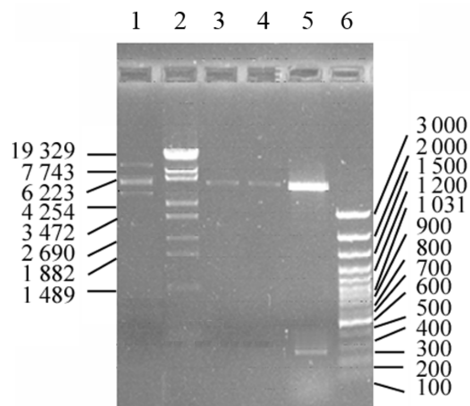


그림 2. GLP-1 4량체발현운반체에 대한 각이한 제한효소분해산물의 1% 아가로즈겔전기영동상
1－pET24b-GLP1, 2－분자크기표식자(λDNA/*Eco*14TI), 3－pET24b-GLP1/*Nde* I, 4－pET24b-GLP1/*Xho* I, 5－pET24b-GLP1/(*Nde* I＋*Xho* I), 6－분자크기표식자(DNA 100bp Ladder)

그림 1에서 보는바와 같이 GLP-1 4량체의 PCR증폭산물의 분자량은 예상분자량(357bp)과 일치하였다.

다음으로 증폭된 PCR단편과 발현운반체 pET24b(+)를 각각 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I로 동시절단하고 리가제반응으로 련결시켜 재조합운반체를 얻은 다음 그 정확성을 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 GLP-1 4량체 발현운반체 pET24b-GLP1을 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I로 각각 분해시켰을 때 예상크기(5 666bp)와 일치한 1개의 단편으로, *Nde* I, *Xho* I로 동시절단하였을 때 pET24b운반체(5 309bp)와 목적하는 GLP-1 4량체유전자단편(357bp)이 얻어졌다. 이것은 재조합발현운반체가 정확히 조립되였다는것을 보여준다.

3) GLP-1 4량체의 발현검토

재조합발현운반체 pET24b-GLP1을 *E.coli* BL21(DE)에 형질전환시키고 카나미찐저항성(Km^r)을 표식자로 하여 형질전환체를 선발한 다음 GLP-1 4량체유전자의 발현을 검토하였다.(그림 3)

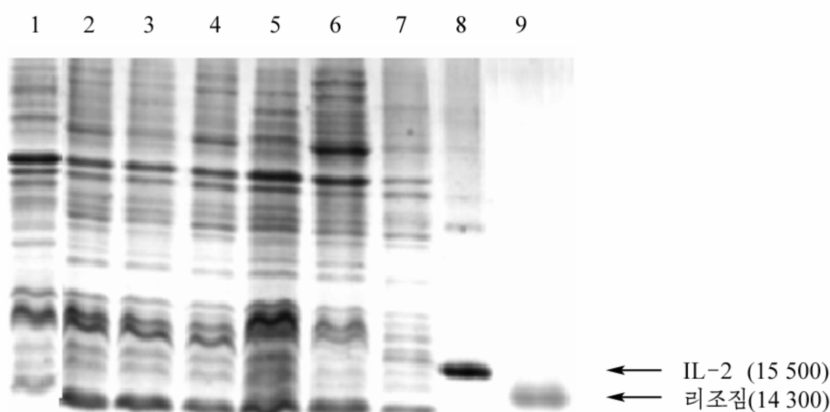


그림 3. GLP-1 4량체의 발현유무를 검토하기 위한 18% SDS-PAGE상
1－비유도, 2－5는 IPTG유도균체(15～27%), 6－초음파상청액,
7－초음파침전, 8－대조(IL-2), 9－대조(리조짐)

그림 3에서 보는바와 같이 IPTG로 유도할 때 비유도에는 없는 GLP-1 4량체단백질이 얻어졌으며 분자량은 예상분자량(13 800)과 일치하였다. 그리고 GLP-1 4량체단백질은 대장균세포질속에서 가용성과 봉입체의 형태로 다 발현되였다. 또한 균그루별로 GLP-1 4량체의 발현수준은 각이하며 최고발현수준은 27%였다.

맺 는 말

1) GLP-1 4량체유전자의 크기는 357bp이며 pET24b(+)의 *Nde* I, *Xho* I위치에 정확히 재조합되였다.

2) 재조합대장균그루 *E. coli* BL21(DE3)(pET24b-GLP1)에서 GLP-1 4량체단백질은 봉입체와 가용성으로 다같이 발현되며 최고발현수준은 27%였다.

참 고 문 헌

[1] L. Patricia; Endocrinology, 151, 1984, 2010.
[2] Liz Chandler et al.; Journal of Diabetes, 19, 1, 32, 2015.
[3] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning 1: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 13～108, 1989.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Construction of Recombinant *E. coli* Strain Expressing Human Glucagon Like Peptide-1(GLP-1) Gene

Ri Jin Chol, *Kang Yong Su*, *Jang Myong Chol* and *Kim Pong Hyok*

We designed and synthesized human glucagon likepeptide-1(GLP-1) gene and constructed recombinant *E. coli* BL21(DE3)(pET24b-GLP1).

GLP-1gene was expressed simultaneously in forms of inclusion body and soluble fraction in *E. coli* and the expression level was about 27%.

Key words: human glucagon like peptide-1, diabetes, gene expression, soluble fraction, inclusion body

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

미생물검사에 리용하는 몇가지 항생소들의 열 및 압력내성

림송경, 오철성, 오희남

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《식료가공공업부문에서 현대과학기술의 성과를 널리 받아들여 식료품을 공업적방법으로 제때에 가공하며 식료품가공에서 위생문화성을 보장하도록 하여야 하겠습니다.》

(《**김정일**선집》 증보판 제10권 355페지)

여러가지 식료품들의 위생안전성을 보장하는데서 미생물검사는 중요한 자리를 차지한다. 오늘날 미생물검사에서는 특종의 미생물들을 선택하기 위하여 항생소들을 배지에 첨가하여 많이 리용한다.[2] 이때 항생소는 일반적으로 세균려과장치를 리용하여 려과한 후 멸균한 배지에 첨가한다.[3] 이 방법은 항생소가 생물기원물질이기때문에 열 및 압력에 잘 견딜수 없다는것으로부터 출발한것이다. 그러나 이 방법은 생산현장들에서는 합리적이지 못하다. 그것은 항생소들을 무균적으로 다룰수 있는 세균려과장치와 복잡한 조작들이 요구되기때문이다.

우리는 미생물검사에 리용하는 항생소들의 열 및 압력내성을 검토하여 그것을 직접 배지에 첨가해줄수 있는 보다 쉬운 방법을 확립하여 생산현장에 적용하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

항생소로는 페니실린G칼리움과 스트렙토미찐, 암피실린, 클로람페니콜을 리용하였다.

배지로는 브릴리안트록담즙산염젖당고기즙(BGBLB)배지와 영양고기즙배지를 리용하였다.

균그루로는 **김일성**종합대학 생명과학부 미생물학강좌에 보존되여있는 *Escherichia coli* 35, *Staphylococcus aureus* ㅁ－1, *Bacillus subtilis* ㅁ－2를 리용하였다.

항생소의 항균력은 선행방법[1]에 준하여 원형려지법과 원통법으로 측정하였다.

결과 및 론의

1) 미생물검사에 리용하는 항생소들의 열내성검토

항생소들을 200U/mL 되게 푼 용액들을 100℃에서 각이한 시간동안 끓이고 그것들의 여러가지 균그루들에 대한 억제특성을 비교하였다.

먼저 가열한 페니실린과 암피실린의 그람양성세균들에 대한 억균력을 보았다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 페니실린과 암피실린은 100℃에서 1h동안 가열하여도 미생물들에 대한 억균력이 변하지 않았다. 이것은 페니실린이나 암피실린이 열에 대하여 대단히 안정하다는것을 보여준다.

우리는 같은 방법으로 스트렙토미찐과 클로람페니콜의 가열후 항균특성을 보았다.(표 2)

표 1. 그람양성균들의 생장에 미치는 가열한 페니실린, 암피실린의 작용특성

가열시간/min	*Bacillus subtilis* ㅁ—2		*Staphylococcus aureus* ㅁ—1	
	페니실린	암피실린	페니실린	암피실린
0	+	+	+	+
20	+	+	+	+
40	+	+	+	+
60	+	+	+	+

\+ 강하게 억제

표 2. 그람양성 및 그람음성세균들의 생장에 미치는 가열한 스트렙토미찐, 클로람페니콜의 작용특성

가열시간/min	*Staphylococcus aureus* ㅁ—1		*Escherichia coli* 35	
	스트렙토미찐	클로람페니콜	스트렙토미찐	클로람페니콜
0	+	+	+	+
20	+	+	+	+
40	+	+	+	+
60	+	+	+	+

\+ 강하게 억제

표 2에서 보는바와 같이 스트렙토미찐과 클로람페니콜도 100℃에서 1h동안 가열하여도 미생물들에 대한 억균력에서는 변화가 없었다. 이것은 스트렙토미찐이나 클로람페니콜이 열에 대단히 안정하다는것을 보여준다.

실지 열에 의한 미세한 억균력의 변화도 없겠는가를 판정하기 위하여 같은 량의 페니실린을 각이한 시간동안 열처리한 후 원통법을 리용하여 억균띠의 크기를 비교하였다.(표 3)

표 3. 가열한 페니실린의 그람양성균들에 대한 억균특성

가열시간/min	억균띠크기/mm	
	Bacillus subtilis ㅁ—2	*Staphylococcus aureus* ㅁ—1
0	33	27
20	34	29
40	32	28
60	34	27

페니실린단위 200U/mL

표 3에서 보는바와 같이 페니실린을 가열했을 때에도 실제적으로 억균띠크기에서는 변화가 인정되지 않았다. 이것은 실제로 열이 페니실린의 억균특성에 큰 변화를 일으키지 않는다는것을 보여준다. 이로부터 우리가 리용한 항생소들은 가열해도 일없다는 결론을 얻게 되였다.

2) 미생물검사에 리용하는 항생소들의 압력내성검토

우리는 우에서 리용한 항생소들에 대한 압력내성검토를 진행하였다. 그것은 실제로 항생소들을 배지에 직접 넣어 고압멸균할수 있겠는가를 보기 위해서였다.

여러가지 항생소들을 200U/mL 되게 푼 용액들을 0.05MPa(112℃), 0.1MPa(121℃)에서 각각 30, 15min동안 처리한 후 여러가지 균그루들에 대한 그것들의 억균특성을 보았다.(표 4)

표 4. 고압처리한 항생소들의 몇가지 세균들에 대한 작용특성

시험균그루	0.05MPa(112℃)				0.1MPa(121℃)			
	페니실린	암피실린	스트렙토미찐	클로람페니콜	페니실린	암피실린	스트렙토미찐	클로람페니콜
Bacillus subtilis ㅁ－2	－	－	－	－	－	－	－	－
Staphylococcus aureus ㅁ－1	－	－	－	－	－	－	－	－
Escherichia coli 35	＋	＋	－	－	＋	＋	－	－

＋ 균이 자란것, － 균이 자라지 못한것

표 4에서 보는바와 같이 실험에 리용한 모든 항생소들이 고압멸균후에도 자기의 억균특성을 그대로 유지하였다. 이것은 이 항생소들을 미생물검사때 얼마든지 배지에 넣어 멸균하여 리용할수 있다는것을 보여준다.

맺 는 말

미생물신속검사에 리용하는 페니실린과 암피실린, 스트렙토미찐, 클로람페니콜은 열과 압력을 작용시킬 때 억균특성이 변하지 않으므로 배지에 직접 넣어 멸균하여 리용할수 있다.

참 고 문 헌

[1] 김련화; 미생물학전공실험, **김일성**종합대학출판사, 53～54, 주체95(2006).
[2] 리정경 등; 생물학, 4, 32, 주체106(2017).
[3] Heide Scatten; Salmonella, Humana Press, 47～62, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Resistance on the Heat and Pressure of Some Antibiotics for the Microorganism Examination

Rim Song Gyong, O Chol Song and *O Hui Nam*

Penicillin, ampicillin, streptomycin and chloramphenicol which are used for the rapid test of microorganism are stable in their bacteriostatic characteristics under high temperature and pressure.

Key words: antibiotic substance, heat, pressure

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

Monascus sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074의 형태학적특징 및 시트리닌, 색소생성능의 비교

윤리남, 한성수, 오희남

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학연구부문에서는 나라의 경제발전과 인민생활향상에서 전망적으로 풀어야 할 문제들과 현실에서 제기되는 과학기술적문제들을 풀고 첨단을 돌파하여 지식경제건설의 지름길을 열어놓아야 합니다.》

최근 식료공업부문에서 홍곡균이 생성하는 색소를 감홍로생산과 꼴바싸생산에 리용[1, 2]하는것을 비롯하여 그 리용범위가 넓어지고있다. 이것은 보다 더 높은 색소생성능을 가지면서도 특히는 홍곡색소생산에서 가장 큰 문제로 제기되는 시트리닌이 거의나 생성되지 않는 새로운 균그루를 요구한다. 이로부터 우리는 시트리닌생성능이 거의 없으면서도 다량의 색소를 생성하는 균으로서 새롭게 분리한 *Monascus* sp. O-1균그루와 국가균주보존연구소에 홍곡색소생성균으로 등록된 *Monascus* sp. 8074균그루의 몇가지 생물학적특징과 특히는 이 두 균그루가 생성하는 색소와 시트리닌함량을 비교하였다.

재료와 방법

재료로는 *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074를 각각 고체배양한 홍곡을 리용하였다.

형태학적특징은 주사굴현미경(《JSM 6610A》)으로 관찰하였다.

색소는 에타놀을 리용하여 추출하였으며 색소생성량은 선행방법[3, 5]에 준하여 측정하였다. 시트리닌생성량은 고속액체크로마토그라프법[4]으로 결정하였다.

결과 및 론의

1) *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074균그루들의 형태학적특징비교

우리는 분리한 *Monascus* sp. O-1과 현재 홍곡색소생산용균그루로 리용되고있는 *Monascus* sp. 8074의 형태학적특징들을 비교하였다. 실험은 두 균그루를 각각 길금즙배지에 접종하고 포자와 색소가 충분히 형성될 때의 특성을 주사굴현미경으로 관찰하고 비교하는 방법으로 진행하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074는 같은 조건에서 배양할 때 분생포자형성특성과 포자크기에서 명백한 차이를 보여주었다.

Monascus sp.O-1과 *Monascus* sp. 8074의 포자낭형태와 분생포자크기는 표 1과 같다.

표 1은 두 균그루가 같은 *Monascus*속에 속하지만 형태학적으로 큰 차이를 가지는 서로 다른 균들이라는것을 보여준다.

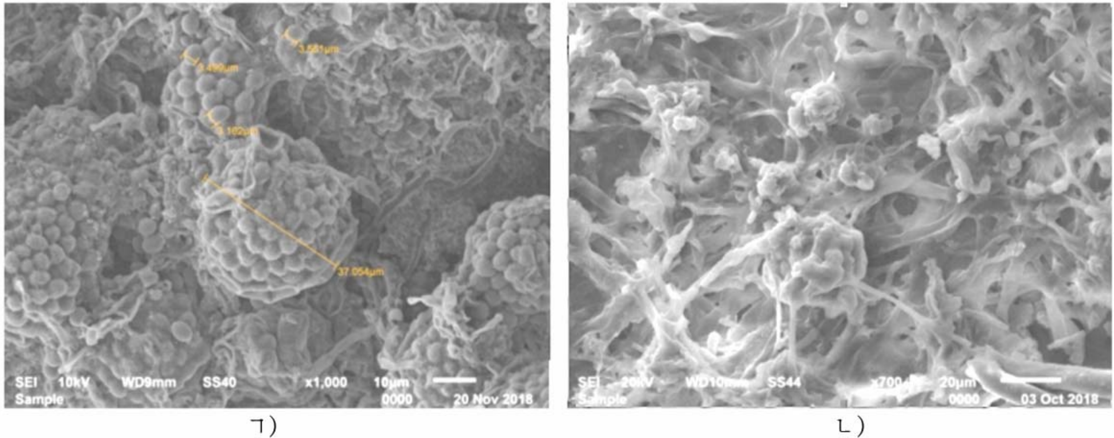


그림 1. *Monascus* sp. 8074와 O-1의 분생포자생성특징
ㄱ) *Monascus* sp. 8074의 포자낭 및 분생포자 ㄴ) *Monascus* sp. O-1의 포자낭 및 분생포자

표 1. *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074의 포자낭형태와 분생포자크기

Monascus sp. 8074		*Monascus* sp. O-1	
포자낭형태	분생포자크기/μm	포자낭형태	분생포자크기/μm
원형의 겉면에 분생포자들이 밀집되여있다.	3.407±0.154	타원형의 겉면에 분생포자들이 성글게 분포되여있다.	1.586±0.291

2) *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074균그루들의 색소 및 시트리닌생성량 비교

Monascus sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074를 찐쌀에 접종하고 배양하여 얻은 홍곡 0.5g을 95% 알콜 10mL에 넣고 70℃의 온도에서 30min동안 색소를 우려냈다.

다음 우려낸 알콜추출물을 100배 희석한 후 자외가시선분광광도계(《Beckman Coulter DU730》)를 리용하여 200nm부터 650nm까지 1nm의 간격으로 련속흡광도를 측정하는 방법으로 두 균의 색소생성량을 비교하였다.(그림 2와 3, 표 2)

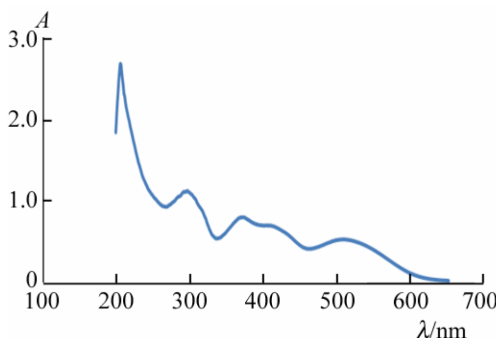


그림 2. *Monascus* sp. 8074색소의 파장에 따르는 흡광도

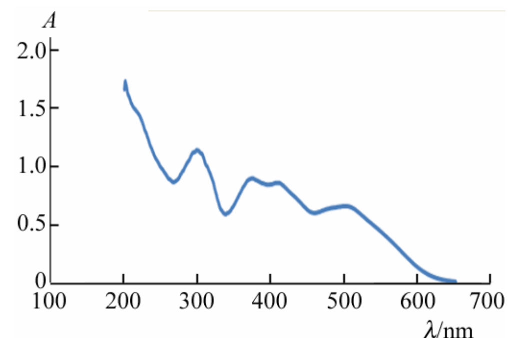


그림 3. Monascus sp. O-1색소의 파장에 따르는 흡광도

표 2에서 보는바와 같이 두 균그루의 배양액에서 다같이 300, 370, 400, 500nm근방에서 흡수극대봉우리가 나타났다. 선행연구자료[4]에 따르면 이 물질들은 *Monascus*속 균그루들을 배양할 때 생성되는 296nm의 흡수극대파장을 가지는 로바스타틴, 410nm의 흡수극대파장을 가지는 모나스코루브린(monascorubrin)과 루브로판크타틴(rubropunctatin), 500nm의 흡수극대파장을 가지는 루브라민(rubramin)과 루브로판크타민(rubropunctamine)이라는것

표 2. *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp.8074가 생성하는 색소들의 흡수극대파장과 흡광도

Monascus sp. O-1		*Monascus* sp. 8074	
흡수극대파장/nm	*A*	흡수극대파장/nm	*A*
299	1.319	293	1.113
374	0.920	372	0.803
408	0.870	404	0.702
499	0.666	507	0.530

을 알수 있다. 다시말하여 두 균그루는 형태학적으로는 큰 차이를 가지지만 다 같은 *Monascus* 속 균그루들로서 같은 색소들을 생성하며 그외의 다른 색소는 생성하지 않았다.

그림 2, 3과 표 2에서 보는바와 같이 분리한 *Monascus* sp. O-1균그루의 색소생성량은 현재 리용하고있는 *Monascus* sp. 8074보다 높다는것을 알수 있다. 이것은 *Monascus* sp. O-1균그루가 사면배양이나 고체배양할 때 언제나 *Monascus* sp. 8074균그루보다 색갈이 진한 리유를 설명해주는 한편 색소생성량이 보다 더 높은 균그루라는것을 보여준다.

다음으로 *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074균그루의 시트리닌생성량을 비교하였다.(표 3)

표 3. *Monascus* sp. O-1과 *Monascus* sp. 8074의 시트리닌생성량

조사지표	균그루	
	Monascus sp. O-1	*Monascus* sp. 8074
시트리닌함량 /(ng·mL^{-1})	0.08±0.01	0.24±0.01

$p<0.05$

표 3에서 보는바와 같이 우리가 분리한 *Monascus* sp. O-1균그루의 시트리닌생성량은 *Monascus* sp. 8074균그루에서보다 훨씬 적었다.

맺 는 말

우리가 분리한 *Monascus* sp.O-1균그루는 현재 홍곡색소생산용균그루로 리용하고있는 *Monascus* sp. 8074균그루와 비교해볼 때 포자낭의 형태와 포자크기에서 차이나는 균그루이다.

분리한 *Monascus* sp. O-1균그루는 *Monascus* sp. 8074보다 색소생성량이 더 높은 반면에 시트리닌생성량은 1/3이다.

참 고 문 헌

[1] 윤리남 등; 생물학, 2, 34, 주체107(2018).
[2] 한명일; 식료공업, 1, 2, 주체102(2013).
[3] You-Zhi Wang et al.; Food Microbiology, 22, 145, 2005.
[4] Xiao-Wei Zhang et al.; IERI Procedia, 5, 344, 2013.
[5] Xu Xiong et al.; Process Biochemistry, 50, 180, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Comparison of the Morphological Characteristics, Citrinin and Pigment Production Capacity between *Monascus* sp. O-1 and *Monascus* sp. 8074

Yun Ri Nam, Han Song Su and *O Hui Nam*

In comparison with strain *Monascus* sp. 8074, which has been recently used as a strain of pigment production, the strain *Monascus* sp. O-1, which has been isolated, is morphologically different and it has a higher pigment production capacity, whereas is lower by a third in citrinin production amount.

Key words: *Monascus*, citrinin, pigment

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제1호

쌀겨우림물에서 γ－아미노버터산생성조건에 관한 연구

한경애, 최설향

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《의학과학기술을 빨리 발전시키고 보건부문에 대한 물질적보장사업을 개선하여야 합니다.》

지금 세계적으로 뇌의 기능을 높이고 뇌대사기능부전에 의한 정신병치료에 효과가 높으며 뇌부활제로서뿐아니라 당뇨병과 고혈압, 암과 관절염을 비롯한 질병치료에서 효과가 좋은 γ－아미노버터산(GABA)을 생산하기 위한 연구[3, 4]가 광범히 진행되고있다.

GABA생산은 일반적으로 젖산균을 비롯한 여러가지 미생물에 의한 발효에 의존하고 있다.[1, 2]

우리는 미생물배양에 의존하던 종전의 연구와는 달리 식료부산물인 쌀겨를 효소원으로 리용하여 GABA를 손쉽게 대량생산하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

GABA생성의 기질로 쓰이는 L－글루타민산소다로서는 식용맛내기(순도 99%이상)를, 효소원으로서는 갓 정미한 쌀겨(현미를 9분도 되게 깎은 쌀겨)를 구입하여 랭동기에 보관하면서 리용하였다.

우리는 쌀겨대 물의 질량비, 글루타민산소다농도, 온도, 반응시간 등 GABA생성에 영향을 주는 여러가지 인자들을 변화시키면서 생성되는 GABA의 량을 측정하여 GABA생성조건을 검토하였다.

γ－아미노버터산정성분석은 크로마토그라프법으로 진행하였다. 전개용매로서 n－부타놀：초산：물=2：2：1 혼합용액을 리용하였으며 여기에 총 전개액의 0.2% 되는 닌히드린을 넣었다. 전개 및 발색은 먼저 시료반점과 표품반점을 크로마토그라프용종이의 밑부분으로부터 1.5cm 되는 곳에 찍고 전개용액을 종이가 1cm 잠기도록 부었다. 다음 미리 전개용매로 포화시킨 전개함에 넣고 전개거리가 8cm이상 될 때까지 전개(1.5h정도)시킨 후 100℃에서 건조시키면서 발색시켰다. 이때 나타난 반점들의 R_f값을 구하고 γ－아미노버터산의 R_f값과 일치되는 점을 찾았다.

γ－아미노버터산정량분석은 크게 크로마토그라프화상처리기술에 의한 상대분석과 아미노산분석기에 의한 절대분석의 두가지 방법으로 진행하였다. GABA생성에 영향을 주는 여러가지 인자들을 변화시킬 때 생성되는 GABA량의 상대적인 비교는 종이크로마토그라프분석과 콤퓨터화상처리기술을 리용하여 진행하였다. 표품용액(2.5mg/mL, 《Sigma》)과 시료용액을 함께 크로마토그라프용종이에 찍고 전개를 8cm이상 진행한 다음 100℃에서 발색시키고 사진기로 찍어 고착시킨 후 MATLAB의 화상처리기능을 리용하여 농도를 계산하였다. 생성조건이 일정하게 확립된 다음 반응액의 정확한 GABA량은 자동아미노산분석장치(《HITACHI L-8900》)를 리용하여 정량하였다.

결과 및 론의

쌀겨대 물의 질량비의 영향 쌀겨대 물의 질량비를 합리적으로 정하는것은 쌀겨에서 글루타민산탄산떼기효소(GAD)를 충분히 추출할뿐아니라 반응에 필요한 효소농도를 보장하여 GABA생성률을 높이기 위한 중요한 조건으로 된다. 10g의 쌀겨를 각이한 량의 물에 현탁시키고 여기에 글루타민산과 소금을 1% 되게 첨가한 후 36℃에서 5일간 반응시킬 때 GABA생성률은 쌀겨대 물의 질량비 1:10에서 제일 높았다.(그림 1)

글루타민산소다농도의 영향 글루타민산소다의 농도를 0.5～2.5%로 변화시킬 때 GABA생성량은 1.0%에서 가장 높았고 더이상 증가하지 않았다.(그림 2)

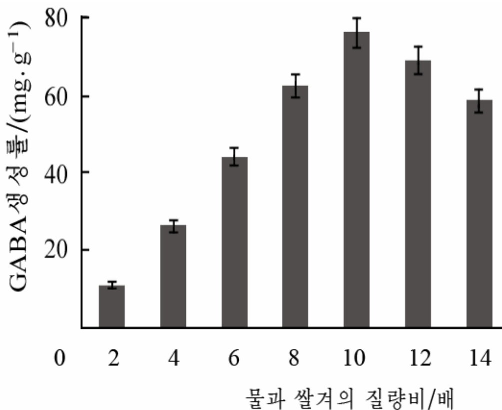


그림 1. 물과 쌀겨의 질량비에 따르는 GABA생성률의 변화

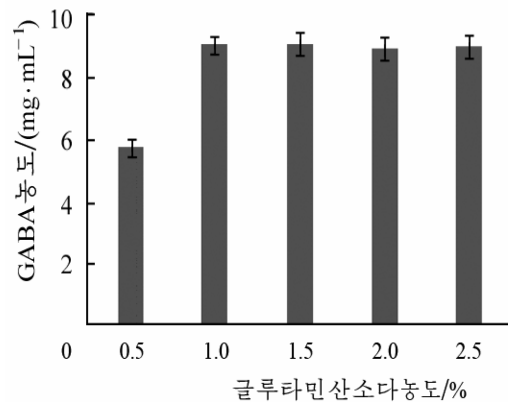


그림 2. 글루타민산소다농도에 따르는 GABA농도의 변화

이것은 일반적으로 글루타민산소다의 농도를 2.0%이상으로 첨가해주던 선행연구[1, 2]에 비해볼 때 경제적으로 실리있는것으로 된다.

GABA생성에 미치는 온도의 영향 효소반응이 최적화되는 온도조건을 검토하기 위하여 우리는 우의 결과에 기초하여 반응계를 구성하고 30℃에서 42℃까지 2℃간격으로 온도를 변화시키면서 5일간 방치한 후 매 반응액의 GABA농도를 측정하였다.(그림 3)

결과 36℃에서 GABA생성량이 제일 높았는데 이것은 글루타민산데카르복실라제의 최적온도가 36℃라고 한 선행연구자료[5]와 일치하였다.

GABA생성에 미치는 방치일수의 영향 반응계를 구성하고 방치일수에 따르는 GABA생성량을 검토한 결과 그림 4에서 보는바와 같이 5일째에 GABA농도가 제일 높았고 7일째부터는 감소하기 시작하였다.

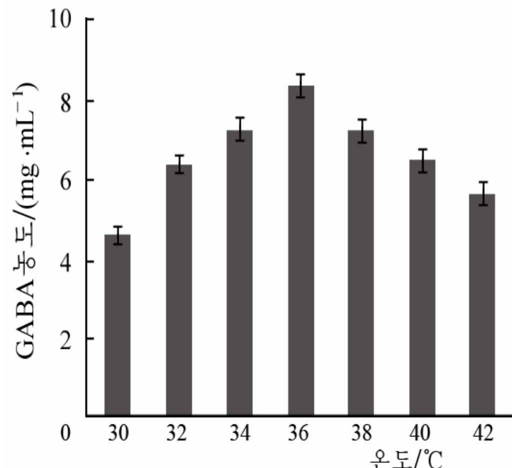


그림 3. 온도에 따르는 GABA농도의 변화

효소반응은 일반적으로 반응시간이 상당히 짧지만 우리의 연구에서는 충분히 반응하는데 5일이 걸렸다. 이것은 쌀겨에서 효소가 충분히 추출되여나오는 시간의 결과라고 보아진다. 즉 추출조건을 개선하면 시간을 훨씬 단축할수 있다고 본다.

소금농도의 영향 일반적으로 소금은 미생물배양때 배양액의 삼투압을 조절하고 미생물의 생육에 영향을 주는것으로 하여 미생물에 의한 GABA생성방법에서 중요하게 론의되였다. 우리의 연구에서는 미생물배양이 진행되지 않지만 GAD의 활성화에 Cl^-이 관여한다는 선행연구[5]에 근거하여 GABA생성에 소금이 영향을 미칠수 있다고 보고 그 영향을 검토하였다.

소금의 농도를 0～2.5%까지 점차 증가시킬 때 GABA생성량은 변화가 없었다. 즉 Cl^-이 GAD의 활성화에 관계되지 않는다는것을 알수 있다. GAD를 활성화하는 기본인자는 GAD의 도움효소인 피리독살린산인데 쌀겨에는 그것의 전구체인 피리독신(비타민B_6)이 풍부히 들어있어 GAD가 충분히 활성화되였으며 이로부터 Cl^-의 영향을 받지 않았다고 보아진다.

초기pH의 영향 GAD에 의해 글루타민산이 γ—아미노버터산으로 전환되는데 H^+이 필요하므로 GABA생성에는 반응계의 pH가 중요하다.

pH의 영향을 검토하기 위하여 반응계의 초기pH를 변화시키면서 GABA생성량을 측정한 결과 pH 5.0에서 제일 높았다.(그림 5)

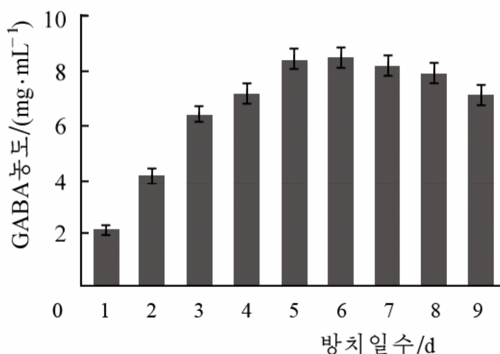


그림 4. 방치일수에 따르는 GABA농도의 변화

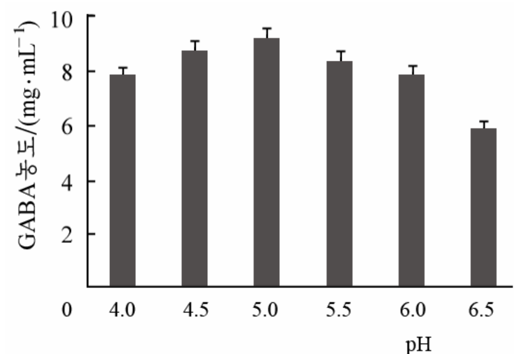


그림 5. 초기pH에 따르는 GABA농도의 변화

아미노산분석기에 의한 반응산물의 정량분석 GABA생성에 미치는 여러 인자들의 영향을 분석한데 기초하여 우리는 쌀겨와 물의 질량비를 1∶10, 글루타민산소다농도를 1.0%, 반응액의 초기pH를 5.0으로 하고 36℃에서 5일간 반응시킨 후 얻어진 반응산물을 자동아미노산분석기를 리용하여 분석하였다.

분석결과 반응액에는 GABA(1.2mg/mL)뿐아니라 로이신(0.14mg/mL), 이소로이신(0.10mg/mL), 페닐알라닌(0.12mg/mL)을 비롯한 필수아미노산들이 많이 들어있었다.(그림 6)

이때 GABA생성거둠률은 쌀겨 1g당 12mg으로서 이것은 *Asp. oryzae* 8041의 고체배양물 1g당 8.5～9mg의 GABA를 생산한다고 한 선행연구[1]와 그밖의 미생물을 리용한 생산방법에 비해볼 때 높은 량이다.

또한 쌀겨를 효소원으로 하여 Tris, 레몬산, 붕산완충액속에서 글루타민산으로부터 GABA를 생산한 선행연구[6]에서도 생성거둠률은 쌀겨 1g당 5.05mg밖에 되지 않았다. 이것은 쌀겨를 리용하여 GABA를 생산하는 우리의 방법이 원가와 로력이 적게 들면서도 생성거둠률이 높은 합리적인 방법이라는것을 보여준다.

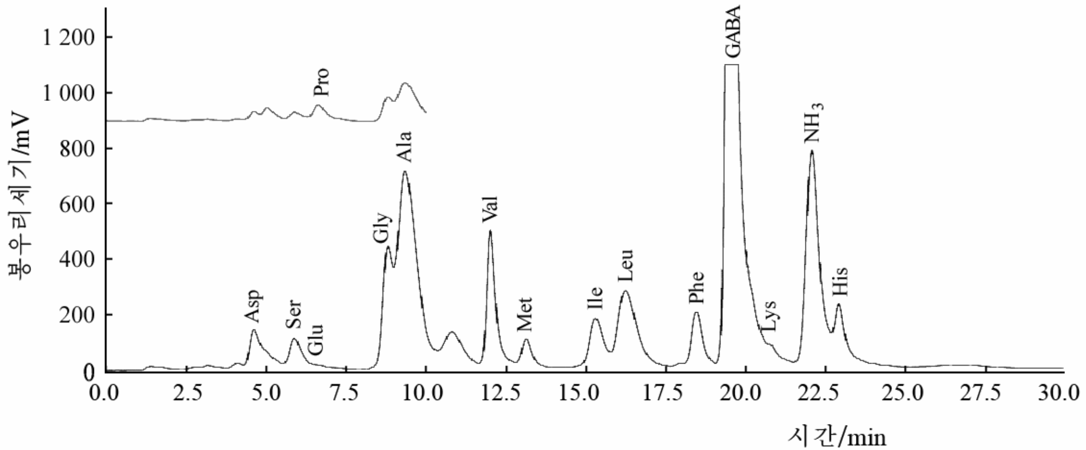


그림 6. 반응액의 L-8900이온교환크로마토그람

맺 는 말

쌀겨와 물의 질량비를 1∶10, 글루타민산소다농도를 1.0%, 반응액의 초기pH를 5.0으로 하고 36℃에서 5일간 반응시킬 때 생성되는 GABA량은 쌀겨 1g당 12mg이다.

참 고 문 헌

[1] 공순혁 등; 조선약학, 1, 18, 주체97(2008).
[2] 김명주 등; 기초의학, 3, 36, 주체92(2003).
[3] K. Li et al.; Neuroscience Bulletin, 24, 195, 2012.
[4] A. M. Abdou et al.; Biofactors, 26, 201, 2006.
[5] S. Ryoiti et al.; Journal of Biology and Chemistry, 235, 1649, 1960.
[6] A. Eamarjharn et al.; Agriculture and Natural Resources, 50, 80, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Condition for Production of γ-Aminobutyric Acid in Rice Bran Extract

Han Kyong Ae, *Choe Sol Hyang*

The optimum condition for production of GABA by using rice bran is as follows: the mass ratio of water to rice bran is 10, the concentration of glutamate is 1%, initial pH is 5, temperature is 36℃ and the incubation time is 5days.

Under this condition, GABA content is 1.2mg/mL and productivity is 12mg/g(bran).

Key words: γ-aminobutyric acid(GABA), rice bran, glutamate decarboxylase(GAD)

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)에서 B형간염비루스속질항원(HBcAg)을 발현시키기 위한 연구

최수성, 박숙영, 윤재성

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《…의학과학의 새로운 분야를 개척하며 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 받아들이기 위한 연구사업을 힘있게 벌려야 합니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제11권 81～82페지)

지금 세계적으로 4억명의 사람들이 B형간염비루스(HBV)에 감염되여있으며 그중 해마다 약 백만명의 사람들이 간세포암(HCC)과 같은 말기간장질병으로 사망하고있다.[4]

B형간염비루스속질항원(HBcAg 혹은 HBc항원)은 B형간염의 진단 및 치료에서 매우 중요한 자리를 차지한다. 특히 재조합HBc항원은 B형간염속질항체진단시약생산뿐아니라 B형간염치료왁찐의 조성성분으로 그리고 유전자약물담체로 널리 리용되고있다.

우리는 재조합HBc항원효모발현운반체(pPIC9K-HBc, 9.55kb)를 만든데 기초하여 이것을 메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)에서 발현시키기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료 메타놀동화성효모그루로는 *Pichia pastoris* GS115(HIS4)를, 재조합HBc항원효모발현운반체로는 pPIC9K-HBc(9.55kb)를 리용하였다.

배지로는 BMGY액체(평판)배지, BMMY액체(평판)배지, YPD액체(평판)배지, MG액체(평판)배지, MM액체(평판)배지, 무기염합성배지(5×NPK, 50×MCS, 2% 글리세롤)를 썼다.

시약으로는 도데실류산나트리움－폴아겔전기영동(SDS-PAGE)시약과 HBc속질항체감작지시혈구(RPHA, 의학생물학연구소)를 리용하였다.

방법 효모균형질전환은 전기천공법(7 500V/cm, 10ms)[2]으로 진행하였다.

형질전환된 재조합HBc항원발현효모균을 최소배지인 MG배지에서 3일간 배양하여 증식유무를 확인한 후 그중 잘 자란 균무지들을 선택하여 BMGY배지에서 증식시킨 다음 BMMY배지로 교체하고 매일 메타놀을 0.5% 첨가하면서 유도배양[2]하였다.

재조합HBc항원발현량은 다음과 같이 측정하였다.

균체농도가 A_{600}=100이 되게 효모배양물을 취하여 원심분리하고 상청액을 버린 다음 마쇄완충액(1mmol/L EDTA, 50mmol/L NaH_2PO_4, 5% 글리세롤, pH 8.0) 1mL와 유리알(직경 0.45mm) 1g을 각각 넣고 진탕기(《Vortex》)에서 5min동안 마쇄한다. 마쇄액을 원심분리한 다음 상청액을 10배씩 3번 련속희석(1 000배)하고 2계단희석하여 희석계렬을 만들었다. 여기에 감작혈구를 떨구어 HBc속질항원의 종말력가($-\log_2$)를 측정하였다.

재조합발현산물의 분자량은 12.5% 도데실류산나트리움－폴리아크릴아미드겔전기영동법(SDS-PAGE)[3]으로 결정하였다.

Falcon병(배양액 10mL)에 의한 배양과 플라스크(배양액 100mL)배양은 주기식으로, 30L

탕크배양은 자동배양장치(《Marushi》)에서 련속첨가방식으로 진행하였다.

메타놀농도측정은 선행방법[1]에 준하여 진행하였다.

결과 및 론의

1) 전기천공법에 의한 재조합발현운반체의 숙주내도입

재조합발현운반체 pPIC9K-HBc를 숙주인 *Pichia pastoris* GS115와 혼합하여 전기천공한 다음 MG배지에 도말하였다.

배양시간에 따라 균무지의 형성유무를 관찰하였는데 24h 되였을 때에는 균무지가 나타나지 않았으나 48h 되였을 때에는 0.6mm, 60h 되였을 때에는 1.2mm 크기의 균무지가 나타났다. 나타난 총균무지수는 420개이상이였다.

2) 재조합효모의 HBc항원단백질발현효과판정

우에서 나타난 균무지들을 80개씩 나누어 각각 5개의 BMGY평판배지에 옮기고 매 평판에서 임의로 10개를 선택하여 HBc항원력가를 평가하였다.(표 1) 이때 HBc항원력가가 12이하(–$\log_2$)인 균그루들은 표 1에 반영하지 않았다.

표 1. 균무지번호에 따르는 재조합효모의 HBc항원력가(-$\log_2$)

균무지 번호	HBc항원력가	균무지 번호	HBc항원력가
1－4	13	4－4	13
1－9	13	4－9	14
2－4	13	5－2	13
3－5	14	5－6	14
3－6	13	5－8	13

표 1에서 보는바와 같이 항원력가가 12이상인 균무지들의 HBc항원력가는 평균 13～14였으며 여기서 력가가 제일 높은 3개의 균무지들(3－5, 4－9, 5－6)을 선택하였다. 배양규모를 달리하면서 최종적으로 3－5균그루를 선택하였다.

3) 배양규모에 따르는 재조합효모의 발현특성

소규모배양에서의 발현특성 재조합효모를 Falcon배양병(배양액 10mL)과 플라스크(배양액 100mL)에서 2일간 증식시킨 다음 매일 0.5%의 메타놀을 첨가하여 유도배양하면서 유도배양기일에 따르는 HBc항원력가를 평가하였다.(표 2)

표 2. 배양규모와 배양시간에 따르는 재조합효모의 발현특성

배양규모	지 표	배양시간						
		0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h
10mL	A_{600}	2.0	14.8±0.3*	24.3±0.4*	32.6±0.6	34.4±0.5	35.3±0.4	36.2±0.5
	HBc항원력가	－	－	－	11.3±0.3*	14.3±0.3	14.7±0.3	13.3±0.3
100mL	A_{600}	2.0	18.5±0.4*	28.4±0.3*	35.5±0.4*	39.2±0.4	41.3±0.4	43.4±0.3
	HBc항원력가	－	－	－	13.3±0.3*	15.7±0.3	16.3±0.3	15.3±0.3

n=3, * $p<0.05$, 96h과 비교

표 2에서 보는바와 같이 배양규모에 관계없이 72h까지 즉 유도배양 1일까지 증식성이 높았으며 그 이후로는 증식성이 완만하였다. HBc항원력가는 유도 2일 즉 배양 96h에 유의하게 높아졌으며 그 이후로도 높아지는 경향성이 있었으나 유의한 차이는 인정되지 않았다.

10mL와 100mL 배양규모의 차이에 따라 균증식과 속질항원력가변화곡선은 류사하였으나 속질항원발현력가는 100mL 배양규모일 때 2배로 높았다.

30L 배양장치에서의 발현특성 소규모배양에서와 같이 주기식배양이 아니라 30L 배양장치에서 무기염배지와 글리세롤 및 메타놀을 첨가하면서 HBc항원발현력가를 측정하였다. 이때 산소봄베를 리용하여 산소를 주입(주입압력 2기압, 탕크내압 1기압)하고 암모니아수로 낮아진 pH를 5～6으로 보정하였으며 증식배양 3일만에 메타놀유도배양을 진행하였는데 그 결과는 그림 1과 같다.

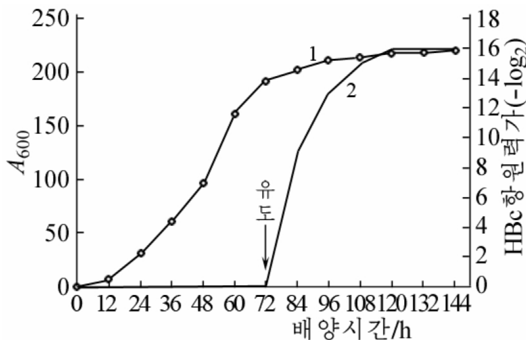


그림 1. 30L 배양장치에서 유도배양기일에 따르는 증식곡선
1－A_{600}, 2－HBc항원력가

그림 1에서 보는바와 같이 증식배양 3일까지 균체농도는 지수함수적으로 증가(A_{600}≈200)하였으며 유도배양이 시작되여서는 완만하게 증식하였는데 유도배양 3일(배양일수 6일, 144h)에 균체농도는 220(A_{600})으로서 플라스크배양의 5배이상이였다.

또한 HBc항원발현력가는 유도배양 2일에 16(–$\log_2$)으로서 가장 높았으며 그 이후로는 력가에서 차이가 나타나지 않았다. 또한 배양장치를 리용하여 배양할 때 균체농도가 매우 높아졌으나 균체농도(A_{600}=100)당 발현력가에서는 차이가 없었다.

4) SDS-PAGE에 의한 발현산물의 확인

SDS-PAGE법으로 중합체인 HBc항원의 분자량을 측정하여 발현산물이 속질항원단백질인가를 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 HBc항원유전자가 통합된 메타놀동화성효모에서는 메타놀로 유도배양하였을 때 약 21kD근방에서 단백질띠가 나타났지만 대조에서는 발현띠가 나타나지 않았다. 속질항원의 단량체분자량이 21 000Da이므로 이것은 효모에 통합시킨 속질항원유전자가 발현되였다는것을 보여준다.

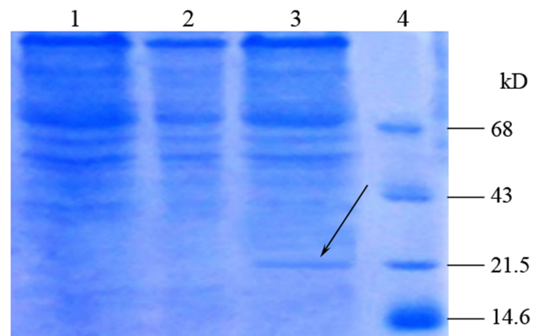


그림 2. HBc항원의 발현확인을 위한 SDS-PAGE영동상(12.5%)
1－GS115유도, 2－GS115/HBc(비유도), 3－GS115/HBc(유도), 4－단백질 분자량표식자(kD)

맺 는 말

1) 전기천공법으로 재조합발현운반체 pPIC9K-HBc(9.5kb)를 *Pichia pastoris* GS115에 형질전환시키고 HBcAg유전자가 발현된다는것을 확인하였다.

2) HBcAg항원력가는 배양규모에 관계없이 유도배양 2일째부터 유의하게 높아지고 그 이후부터는 큰 차이가 없었으며 배양장치에 의한 무기염첨가배양에서 균증식성이나 HBc항원발현력가를 유의하게 높일수 있었다.

참 고 문 헌

[1] 고봉국 등; 조선민주주의인민공화국 약전, 의학과학출판사, 66～163, 주체92(2003).
[2] R. David et al.; Pichia Protocols, Humana Press, 1～278, 2005.
[3] D. Rolland et al.; Journal of Chromatography, B 753, 51, 2001.
[4] C. A. Hayden et al.; Vaccine, 33, 2881, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Study on Expressing Hepatitis B Virus Core Antigen(HBcAg) in *Pichia pastoris* GS115

Choe Su Song, Pak Suk Yong and *Yun Jae Song*

Pichia pastoris GS115 is transformed with pPIC9K-HBc by electroporation and HBcAg is identified with expression product.

The titre of HBcAg is significantly higher at induction culture 2nd day and isn`t higher after 2 days. The growth of *Pichia pastoris* and the titre of HBcAg expression are significantly higher in the inorganic compound adding incubation.

Key words: HBcAg, expression, *Pichia pastoris*

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-HBcAg)로부터 재조합B형간염속질항원을 정제하기 위한 연구

문성철, 량명룡, 윤재성

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《진단과 치료방법을 개선하여야 치료예방사업을 높은 수준에 올려세울수 있으며 병을 잘 치료하여 사람의 건강을 빨리 회복시킬수 있습니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제11권 76페지)

세계적으로 수많은 사람들이 B형간염비루스(HBV)에 의한 감염[3]으로 고통받고있으나 그에 대한 효과적인 진단과 치료대책이 똑바로 세워져있지 않은 결과 그중의 적지 않은 사람들이 간암과 같은 말기간장질병으로 사망하고있다.

B형간염의 진단 및 치료에서 B형간염비루스속질항원(HBcAg 혹은 HBc항원)이 널리 리용[2]되고있는데 이로부터 우리는 B형간염비루스속질항원(HBcAg)유전자를 발현하는 메타놀동화성효모 *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg)체계를 구축한데 기초하여 효모균체로부터 재조합HBc항원을 분리정제하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

분리정제할 균체로는 무기합성배지에서 자래운 HBc항원발현메타놀동화성효모(*Pichia pastoris* GS115)를 리용하였으며 HBcAg분리정제에 리용한 시약으로는 효모마쇄완충액(1mmol/L EDTA, 50mmol/L 린산완충액, 5% 글리세롤, pH 8.0), 겔려과완충액(50mmol/L 린산완충액, 150mmol/L NaCl, pH 7.4), 류산암모니움, HBc항체감작지시혈구(RPHA, 의학생물학연구소)를 리용하였다.

설비 및 기구로는 30만려과막카세트(《Advantec》), 한외려과기(《Advantec》), 세파로즈CL-4B담체 및 효모마쇄기(《Dyn0-Mill》), 고속랭동원심분리기(《Tomy》), 항원수욕조(《Advantec》), 덴시토메터(《Advantec DM-303》)를 리용하였다.

단백질정량은 비우레트법(Biuret법)과 브라드호드법(Brsdford법)으로 진행하였고 특이HBc항원의 정량은 HBc항원력가측정과 도데실류산나트리움－폴아겔전기영동(SDS-PAGE)에 의한 순도평가로 진행하였다.

분리정제는 다음의 방법으로 하였다.

효모균체농도(A_{600})가 50～300 되게 마쇄완충액에 풀고 유리알(직경 0.45mm, 균체량의 80%)과 함께 효모마쇄기에 넣은 다음 3～11min동안 마쇄한다. 원심분리하여 균체마쇄상청액을 회수하여 각이한 온도(30～70℃)와 시간(10～80min)에서 처리하고 원심분리하여 상청액을 수집한다. 그다음 30만려과막카세트와 2만한외려과막을 통과시켜 우의 상청액을 투석 및 농축한다. 농축된 시료를 10 000r/min의 속도로 원심분리한 다음 상청액을 세파로즈CL-4B(ϕ 2.5cm×100cm)탑에 적제하여 40mL/h의 속도로 용출한다. 분획들에 대한 평가를 진행하여 순도(SDS-PAGE분석)가 90%이상 보장된 재조합속질항원시료들을 모은다.[1]

결과 및 론의

1) 마쇄조건에 따르는 재조합효모의 마쇄효과

균체농도(A_{600})를 100으로 하고 마쇄시간을 3～11min까지 변화시키면서 마쇄하여 원심분리한 다음 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가를 측정하였다.(표 1)

표 1. 마쇄시간에 따르는 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가의 변화

시간/min	3	5	7	9	11
총단백질농도/(mg·mL^{-1})	12.3±0.3*	20.6±0.4	21.3±0.3	23.8±0.4*	24.1±0.3*
HBc항원력가(–log$_2$)	12.7±0.3*	15.7±0.3	15.7±0.3	15.7±0.3	15.7±0.3

n=3, * p<0.05(5min과 비교)

표 1에서 보는바와 같이 마쇄시간이 길어질수록 총단백질농도는 높아지는 경향성이 있었으나 HBc항원력가는 마쇄시간 5min부터는 15.7±0.3으로서 더 이상 변화가 없었다.

2) 열처리조건에 따르는 HBc항원의 추출효과

30～70℃ 범위에서 온도를 10℃씩 변화시키면서 60min동안 열처리하였을 때 상청액에서의 총단백질농도와 HBc항원력가의 변화를 보았다.(표 2, 그림 1)

표 2. 열처리온도에 따르는 상청액에서의 총단백질농도 및 HBc항원력가의 변화

온도/℃	대조	30	40	50	60	70
총단백질농도/(mg·mL^{-1})	20.6±0.4*	17.6±0.3	11.4±0.3*	4.1±0.2*	1.9±0.1*	0.6±0.1*
HBc항원력가(–log$_2$)	15.7±0.3	15.7±0.3	15.7±0.3	15.3±0.3	15.3±0.3	11.7±0.3*

n=3, * p<0.05, 30℃와 비교

표 2에서 보는바와 같이 60℃에서 총단백질농도는 (1.9±0.1)mg/mL, HBc항원력가는 15.3±0.3이였으며 그 이상에서는 총단백질농도와 HBc항원력가가 급격히 떨어지는 경향성이 있었다.

그림 1에서 보는바와 같이 열처리온도가 높아지면서 상청액에서 불순단백질은 점차 없어지고 목적하는 항원단백질만 남게 되지만 온도를 너무 높이면 목적단백질의 량도 낮아진다는것을 알수 있다.

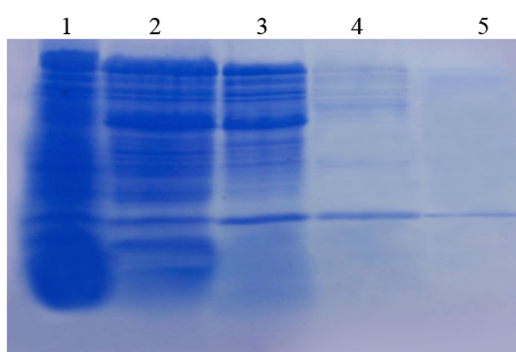


그림 1. 열처리온도에 따르는 HBc항원의 SDS-PAGE상(12.5%)
1－재조합효모마쇄상청액, 2－40℃에서 열처리한 상청액, 3－50℃에서 열처리한 상청액, 4－60℃에서 열처리한 상청액, 5－70℃에서 열처리한 상청액

3) 세파로즈CL-4B탑을 리용한 HBc항원의 정제

열처리한 시료를 30만카세트와 한외려과막(Mw 20 000)을 통하여 농축한 다음 세파로즈CL-4B 겔크로마토그라프법으로 정제하였다.(그림 2, 3)

그림 2에서 보는바와 같이 4번분획(A_{280}=0.7)부터 단백질농도가 높아지기 시작하여 8～9번분획에서 최고(A_{280}=2.5)에 이르렀으며 19번분획까지 떨어졌다가 그 이후로 다시 높아지기 시작하였다. 단백질농도와 HBc항원력가는

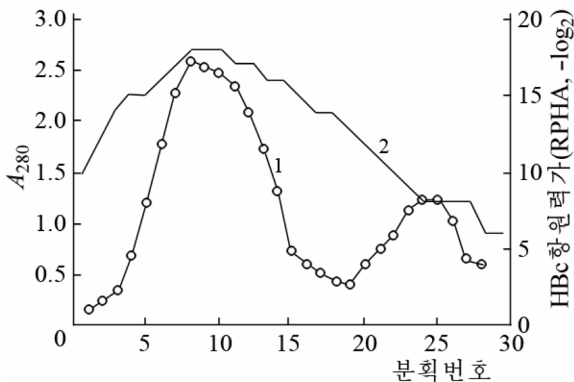


그림 2. 세파로즈CL-4B겔크로마토그람

1－A_{280}, 2－HBc항원력가

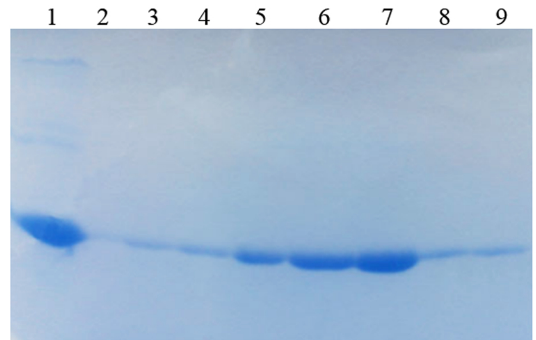
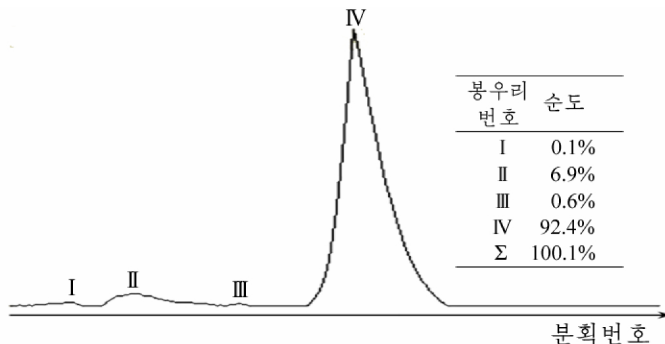


그림 3. 세파로즈CL-4B겔려과크로마토그라프 용출분획들의 SDS-PAGE상(12.5%)

1－정제전시료, 2－3번분획, 3－5번분획, 4－7번분획, 5－8번분획, 6－9번분획, 7－11번분획, 8－13번분획, 9－15번분획

일치하였으며 특히 2번째 봉우리에서 단백질농도(23번분획, A_{280}=0.9)가 높아져도 속질항원력가($-\log_2$)는 10이하였다.

HBc항원력가가 15이상인 분획들(4－15)을 모아 측정한 순도평가결과는 그림 4와 같다.



봉우리 번호	순도
Ⅰ	0.1%
Ⅱ	6.9%
Ⅲ	0.6%
Ⅳ	92.4%
Σ	100.1%

그림 4. 정제한 재조합HBc항원의 덴시토그람

그림 4에서 보는바와 같이 분리정제한 HBc항원의 정제순도는 92%이상이였다.

정제단계별 재조합HBc항원의 순도와 거둠률은 표 3과 같다.

표 3. 정제단계별 HBc항원순도와 거둠률

정제단계	총단백질량 /mg	HBc항원의 순도/%	HBc항원량 /mg	거둠률 /%
마쇄상청	51 500	3.4	1 648	100
열처리	3 040	45.4	1 380	83.7
30만카세트 및 한외려과	1 664	52.3	870	52.7
겔려과	642	92.4	590	35.8

효모균체량 250g

표 3에서 보여주는바와 같이 재조합효모균체 250g으로부터 HBc속질항원을 약 590mg 분리할수 있으며 이때 거둠률은 35.8%이고 정제순도는 92.4%이다.

맺 는 말

Pichia pastoris GS115(pPIC9K-HBcAg)가 발현분비하는 재조합HBc항원을 정제순도 92.4%, 거둠률 35.8%로서 순수하게 정제하였다.

참 고 문 헌

[1] D. Rolland et al.; Jouunal of Chromatography, B 753, 51, 2001.

[2] S. M. Akbar et al.; Hepatology, 52, A438, 2010.

[3] C. A. Hayden et al.; Vaccine, 33, 2881, 2015.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Purification of Recombinant HBcAg from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg)

Mun Song Chol, Ryang Myong Ryong and *Yun Jae Song*

Recombinant hepatitis B core antigen(rHBcAg) is purified with 92.4% in SDS-PAGE purity and 35.8% in recovery from *Pichia pastoris* GS115(pPIC9K-HBcAg).

Key words: HBcAg, *Pichia pastoris*, purification

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

키토잔자성나노립자고정화 5′－린산디에스테라제의 반응조건에 대한 연구

김진미, 김명숙, 라승룡

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《정보기술, 나노기술, 생물공학을 발전시켜야 새 재료, 새 에네르기, 우주기술, 핵기술과 같은 첨단과학기술분야와 기계, 금속, 채취공업, 경공업, 농업을 비롯한 응용기술분야를 획기적으로 발전시킬수 있으며 시대의 추세에 맞게 경제를 현대화, 정보화할수 있고 나라의 경제구조도 개변할수 있습니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제22권 21페지)

일반적으로 효소들을 고정화하여 리용하면 효소활성을 오래동안 유지할수 있으므로 그 리용률을 높일수 있다.[3, 4]

5′－린산디에스테라제를 키토잔자성나노립자에 고정화하고 그것의 반응조건을 해명하는것은 고정화효소를 리용하는데서 나서는 가장 중요한 요구이다.

이로부터 우리는 키토잔자성나노립자에 고정화한 5′－린산디에스테라제로 RNA를 분해시키기 위한 반응조건을 해명하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

기질(RNA)은 선행방법[2]에 준하여, 키토잔자성나노립자에 고정화된 5′－린산디에스테라제는 선행방법[1]에 따라 제조하였다.

효소의 5′－린산디에스테라제활성은 선행방법[5]에 준하여 결정하였으며 기질의 분해률은 선행방법[6]에 따라 결정하였다. 실험에 리용한 시약들은 모두 분석순이였다.

결과 및 론의

1) 효소반응에 미치는 효소량의 영향

효소량을 0～90U/mL로 변화시키면서 분해률을 검토한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 분해률은 효소량이 증가함에 따라 선형으로 증가하다가 60U/mL이상부터는 변화되지 않았다. 이것은 효소단백질의 농도가 일정한 한계를 벗어나면 서로 취합되여 활성중심이 은페되거나 기질이 부족되기때문이다.

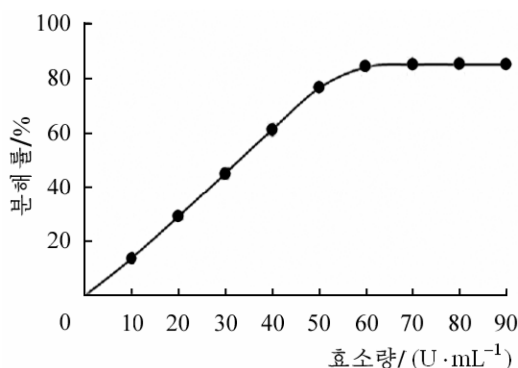


그림 1. 효소량에 따르는 분해률의 변화
기질농도 20mg/mL, 반응온도 70℃, pH 5.5, 반응시간 3h

2) 효소반응에 미치는 반응시간의 영향

반응시간을 1～3h로 변화시키면서 분해률을 검토한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 반응시간 2h까지는 분해률이 선형적으로 증가하다가 그 이후부터는 점차 감소하였다. 그것은 일정한 한계이상으로 반응시간을 연장할 때 효소분해반응과정에 생성된 산물이 5′－린산디에스테라제에 대하여 저해작용을 하기때문이다.

3) 효소반응에 미치는 pH의 영향

반응액의 pH를 4.0～7.5로 변화시키면서 분해률을 측정한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 고정화후 효소반응의 최적pH는 6.0으로서 유리형효소(최적pH 5.5)에서보다 0.5만큼 증가하였다.

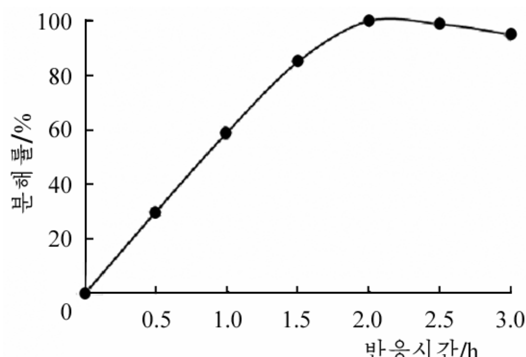


그림 2. 반응시간에 따르는 분해률의 변화
기질농도 20mg/mL, 효소농도 60U/mL,
반응온도 70℃, pH 5.5

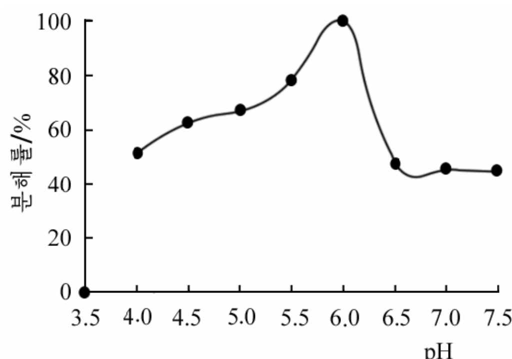


그림 3. pH에 따르는 분해률의 변화
기질농도 20mg/mL, 효소농도 60U/mL,
반응온도 70℃, 반응시간 2h

선행연구[4]에 의하면 페록시다제를 키토잔담체에 고정화하였을 때 유리형효소에서의 최적pH가 5.0이던것이 고정화후에는 5.6으로서 0.6만큼 증가하였다. 유리형효소와 고정화효소에서 이러한 차이가 나타나는것은 키토잔의 다가양이온특성으로 설명할수 있다. 키토잔은 고정화효소의 주위로 보다 많은 히드록실기를 끌어당김으로써 효소의 미소환경에서의 pH가 반응용액상태보다 높게 해주며 결국 pH가 알카리쪽으로 이동한다. 이로부터 고정화효소는 유리형효소보다 더 높은 pH를 요구하게 된다.

4) 효소반응에 미치는 반응온도의 영향

반응온도를 30～90℃로 변화시키면서 분해률을 검토한 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 반응온도를 증가시킴에 따라 분해률이 점차 증가하다가 유리형효소에서는 70℃에서 분해률이 제일 높았지만 고정화효소에서는 80℃에서 제일 높았다. 이것은 고정화에 의하여 효소와 담체사이의 화학결합의 수가 증가하므로 그 결합을 끊는데 보다 많은 에네르기가 소비되기때문이다.

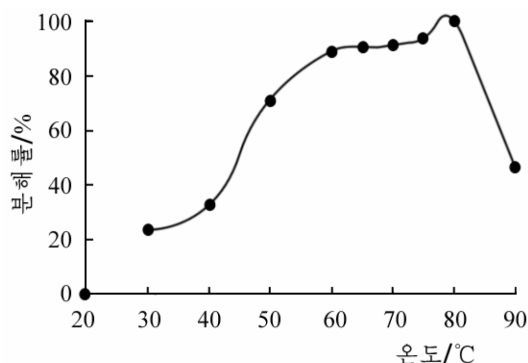


그림 4. 반응온도에 따르는 분해률의 변화
기질농도 20mg/mL, 효소농도 60U/mL,
pH 6.0, 반응시간 2h

맺 는 말

키토잔자성나노립자에 고정화한 5′－린산디에스테라제의 반응조건은 기질농도가 20mg/mL일 때 효소량 60U/mL, 반응시간 2h, 반응액의 pH 6.0, 반응온도 80℃이다.

참 고 문 헌

[1] **김일성**종합대학학보(자연과학), 62, 8, 119, 주체105(2016).
[2] 김진미 등; 생물학, 4, 26, 주체104(2015).
[3] C. Cao et al.; Powder Technol., 260, 90, 2014.
[4] International Conference on Nanostructures(ICNS4), 12, 806, 2012.
[5] N. Prentice; Journal of Cereal Science, 5, 175, 1987.
[6] 李艳 等; 食品科学, 29, 3, 204, 2008.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Reactive Conditions of 5′-Phosphodiesterase Fixed in Magnetic Chitosan-Nano Particles

Kim Jin Mi, *Kim Myong Suk* and *Ra Sung Ryong*

The reactive condition of 5′-phosphodiesterase fixed magnetic chitosan-nano particles has been examined. These are as follows : substrate concentration is 20mg/mL, enzyme amount 60U/mL, reactive time 2h, pH 6.0 and reactive temperature 80℃.

Key words: 5′-phosphodiesterase, chitosan-nano particle, magnetic

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

지연성재조합사람성장호르몬의 보관안정성과 그것에 의한 확장형심근증의 치료효과

김진선, 라현수, 함수웅, 강기찬

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 질병과의 투쟁에서 중요한것은 심장혈관계통질병, 암성질병, 물질대사질병을 비롯하여 병걸린률과 로동능력상실률이 높은 질병을 미리막기 위한 대책을 바로세우는것입니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제11권 72페지)

사람성장호르몬은 몸안에서 연골세포분화와 연골기질세포의 증식을 자극하고 단백질합성을 촉진하며 기름질대사를 조절하여 혈중콜레스테롤농도 및 저밀도기름단백질의 함량을 낮추고 유리기름산의 농도를 높인다.

이것을 성장호르몬의 분비기능이 없거나 약한 어린이들에게 적용하는 경우 키를 크게 하며 중년기이후의 사람들인 경우에는 심근증을 비롯한 심장혈관계통질병, 뼈성김증, 운동시 관절부위아픔, 근육위축, 고지혈증, 복부비만증과 같은 질병치료에도 리용되고있다.[4, 5]

그러나 사람성장호르몬의 체내에서의 반감기가 매우 짧으므로 세계적으로 수식, 미세교갑, 자극응답성겔, 리포솜피복기술과 같은 약물수송계를 리용한 안정성과 효과성을 높이기 위한 연구[6－8]가 진행되고있다.

우리는 재조합사람성장호르몬(rhGH)을 리포솜화하여 만든 지연성재조합사람성장호르몬(SR-rhGH)에 대한 지연효과를 검토[1－3]한데 기초하여 그것의 보관안정성과 확장형심근증(특발성 및 허혈성)환자들에 대한 치료효과를 검토하였다.

재료 및 방법

보관안정성과 확장형심근증치료효과판정은 리포솜에 rhGH을 봉입시켜 제조한 SR-rhGH주사약(2U/mL)을 리용하여 진행하였다.[2]

SR-rhGH의 보관안정성은 －20℃, 4℃와 방온도(25℃)에서 방치시간에 따르는 산화지수, 봉입률, 평균립자크기와 같은 특성변화를 관찰하는 방법으로 진행하였다.

SR-rhGH에 의한 확장형심근증치료효과판정은 심부전환자 100명(연구조 60명, 대조조 40명)을 대상으로 2017년 5월부터 2018년 6월까지 기간에 **김일성**종합대학 평양의학대학병원 순환기내과학강좌와 김만유병원 고혈압과에서 진행하였다.

대조조는 심부전의 일반약(강심제, 리뇨제, 혈관확장제, β－차단제)치료를, 연구조는 심부전의 일반약치료와 함께 SR-rhGH주사(0.05U/kg으로 1일에 1회씩 3～5일 간격으로 근육주사)를 결합하여 30일동안 치료하고 자각증상과 심장초음파검사지표들을 분석하여 SR-rhGH효과를 판정하였다.

결과 및 론의

1) 보관기간과 온도에 따르는 SR-rhGH의 특성변화

SR-rhGH를 −20, 4℃와 방온도(25℃)에서 방치하면서 보관기간에 따르는 산화지수, 봉입률, 평균립자크기를 측정하였다.(표 1)

표 1. 보관기간과 온도에 따르는 SR-rhGH리포솜의 특성변화

지표		보관기간/개월								
		0	3	6	9	12	15	18	21	24
산화지수(OD_{233})	−20℃	0.11	0.11			0.11				0.11
	4℃	0.11	0.13	0.12	0.21	0.21	0.26	0.33	0.37	0.40
	방온도	0.11	0.14	0.18	0.25	0.28	0.38	0.43	0.56	0.72
봉입률/%	−20℃	75.2	75.1			75.2				75.2
	4℃	75.2	74.7	74.3	74.4	72.1	70.9	70.3	69.2	67.5
	방온도	75.2	72.4	72.0	70.9	68.6	65.2	62.8	60.1	56.7
평균립자크기/nm	−20℃	100	100			100				100
	4℃	90	90	90	90	90	90	100	100	100
	방온도	100	110	120	155	160	180	180	200	210

표 1에서 보는바와 같이 −20℃에서 보관하였을 때 SR-rhGH의 산화지수와 봉입률, 립자크기는 2년이 지나도 변하지 않았다. 그러나 4℃와 방온도에서 보관하는 경우 시간이 지남에 따라 산화지수값과 립자크기는 커지고 단백질봉입률은 떨어졌는데 −20℃에서 보관할 때에 비하여 산화지수는 각각 3.6, 6.4배로 높아졌고 평균립자크기는 방온도에서 2배이상으로 높아졌으며 리포솜에 의한 단백질의 봉입률은 4℃와 방온도에서 −20℃의 75.2%로부터 각각 67.5, 56.7%로 낮아졌다. 이것은 처리온도가 높을수록 리포솜을 이루는 린기름질들의 과산화가 더 강하게 진행되며 이때 생성되는 히드록시라디칼종들이 리포솜막의 안정성을 낮추고 리포솜의 봉입률에 영향을 준다는 선행자료[5]와 비교적 일치한다.

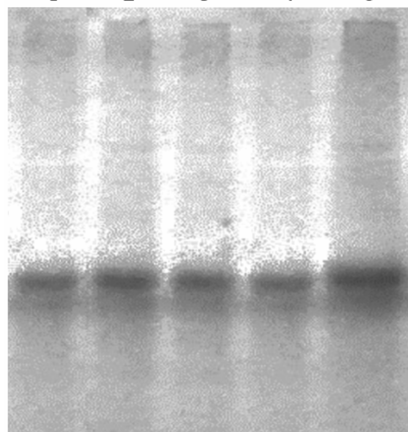


그림. 각이한 온도에서 보관한 SR-rhGH의 SDS-PAGE상
1－처리전 SR-rhGH, 2－−20℃에서 2년 보관한 SR-rhGH, 3－4℃에서 2년 보관한 SR-rhGH, 4－방온도에서 2년 보관한 SR-rhGH, 5－rhGH표품(WHO)

각이한 온도에서 2년동안 보관한 SR-rhGH의 SDS-PAGE결과는 그림과 같다.

그림에서 보는바와 같이 리포솜에 봉입된 rhGH는 2년후에도 분해되지 않았다. 이것은 리포솜이 rhGH를 안정하게 봉입하고있으며 봉입된 rhGH역시 시간이 지남에 따라 분해가 거의 일어나지 않는 안정한 단백질이라는것을 보여준다. 따라서 SR-rhGH는 −20, 4℃에서 2년동안 보관하면서 안전하게 리용할수 있다.

2) SR-rhGH에 의한 확장형심근증의 치료효과

SR-rhGH가 환자의 자각증상에 미치는 영향 확장형심근증(특발성 및 허혈성)환자 100명에 대하여 대조조(40명)는 심부전의 일반약치료를, 연구조(60명)는 심부전의 일반약치료와 함께 SR-rhGH주사를 결합하여 30일동안 치료하면서 숨차기, 가슴답답한 감, 심계항진, 맥없기, 복부팽만감과 같은 자각증상에서의 변화를 관찰하였다.(표 2)

표 2. SR-rhGH로 치료한 환자들에서 자각증상의 변화

구분		숨차기	가슴답답한 감	심계항진	맥없기	복부팽만감	총유효률/%
대조조 (n=40)	치료전	36	38	36	34	36	71
	치료후	32	32	30	26	32	
연구조 (n=60)	치료전	56	50	46	54	46	73
	치료후	47	40	41	48	38	

표 2에서 보는바와 같이 SR-rhGH로 치료한 연구조와 대조조사이에 자각증상에서의 유효성차는 인정되지 않았다.

SR-rhGH가 환자들의 심장초음파지표 및 심장수축기능에 미치는 영향 SR-rhGH가 심장재구축에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 심부전환자에게 SR-rhGH주사약을 주사한 경우 좌심방경(LAD), 좌심실수축말기경(ESD), 좌심실확장말기경(EDD), 확장기말중격두께(IVSTD), 확장기말후벽두께(PWTD)에서의 변화를 측정하였다.(표 3)

표 3. SR-rhGH가 환자들의 심장초음파지표들에 미치는 영향

지표 구분		LAD /cm	ESD /cm	EDD /cm	IVSTD /cm	PWTD /cm
대조조 (n=40)	치료전	4.06±1.02	5.23±1.32	6.24±0.86	0.81±0.12	0.85±0.21
	치료후	4.01±0.92	4.81±0.92*	6.0±0.67	0.85±0.18	0.86±0.21
연구조 (n=60)	치료전	4.08±0.83	5.25±1.13	6.33±1.03	0.88±0.16	0.75±0.14
	치료후	3.86±0.77*, **	4.56±1.04*, **	5.58±0.95*, **	0.9±0.16	0.79±0.13

* $p<0.05$(치료전과 비교), ** $p<0.05$(대조조와 비교)

표 3에서 보는바와 같이 SR-rhGH주사제를 주사한 경우 환자들의 좌심방경(LAD), 좌심실수축말기경(ESD), 좌심실확장말기경(EDD)이 대조조에 비하여 유의성있게 개선되였다는것을 알수 있다.

다음 SR-rhGH를 주사한 후 확장형심근증(특발성 및 허혈성)환자 60명에 대한 심장수축기능을 관찰하였다.(표 4)

표 4에서 보는바와 같이 SR-rhGH로 치료하는 경우 EF(구출률)은 (50.65±15.86)%로서 대조조에 비하여 현저하게 높아졌다.

표 4. SR-rhGH가 환자들의 심장수축기능에 미치는 영향

구분	구출률 EF/%	
	치료전	치료후
대조조(n=40)	33.60±20.27	43.13±15.04*
연구조(n=60)	35.11±15.48	50.65±15.86*, **

* $p<0.05$(치료전과 비교), ** $p<0.05$(대조조와 비교)

SR-rhGH를 주사한 환자들의 혈액학적지표 SR-rhGH를 주사한 후 환자들의 GPT, GOT, WBC, RBC, Th와 같은 혈액학적지표를 검사하였다.(표 5)

표 5. SR-rhGH를 주사한 환자들의 혈액학적지표

구분	GPT	GOT	WBC	RBC($\times10^4$)	Th($\times10^4$)
대조조(n=20)	41.5±3.2	50.2±4.2	6 300±243	385±76	16±0.9
연구조(n=30)	42.8±3.2	52.4±6.2	6 500±132	367±85	15±1.2

표 5에서 보는바와 같이 SR-rhGH를 주사한 연구조의 혈액학적지표를 검사한 결과 대조조와 유의한 차이가 인정되지 않았다.

한편 확장형심근증(특발성 및 허혈성)환자 100명중 SR-rhGH를 30일동안 주사하여 치료한 연구조 60명과 대조조 40명을 대상으로 비교한데 의하면 3개월, 6개월후 연구조에서는 심부전에 의한 재입원환자가 한명도 없었으나 대조조에서는 재입원률이 3개월후에 10%, 6개월후에는 15%였다.

맺 는 말

1) 2년동안 보관하였을 때 SR-rhGH의 산화지수값은 －20℃에서 0.11, 4℃에서 0.40 그리고 방온도에서 0.72로서 －20℃에서 가장 낮았으며 리포솜에 의한 단백질의 봉입률은 －20℃에서 75.2%, 4℃에서 67.5%, 방온도에서 56.7%였다. SR-rhGH립자크기는 －20℃와 4℃에서 큰 변화가 없었으나 방온도에서는 2배이상 커졌으며 2년후에도 리포솜rhGH는 분해되지 않았다.

2) 확장형심근증(특발성 및 허혈성)환자에게 심부전의 일반약물치료와 SR-rhGH주사를 결합하여 30일동안 치료하는 경우 심장초음파지표들과 심장수축기능이 유의하게 개선되고 3개월, 6개월후 심부전에 의한 재입원률이 0%였으나 일반약물치료한 대조조에서 재입원률이 3개월후에는 10%, 6개월후에는 15%였다.

참 고 문 헌

[1] 강현숙; 생물공학학회지, 2, 36, 주체100(2011).
[2] 김옥희 등; 생물학, 2, 19, 주체106(2017).
[3] 김옥희 등; 생물학, 3, 64, 주체106(2017).
[4] Sorina Mihail et al.; Cardian Juornal of Cardiology, 31, 752, 2015.
[5] A. Jostle et al.; Clin. Endocrinol., 62, 5, 623, 2005.
[6] Omar Mohd Atrouse; Pakistan Journal of Biological Sciences, 5, 9, 948, 2002.
[7] K. R. Whiteman et al.; J. Liposome Res., 11, 153, 2001.
[8] Yong-Zhuo Huang et al.; Bio. Pharm. Bull., 28, 2, 387, 2005.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Study on the Storage Stability of the Sustained Releasing Recombinant Human Growth Hormone and Their Therapeutic Effect for Cardiomyopathia Dilatativa

Kim Jin Son, Ra Hyon Su, Ham Su Ung and *Kang Ki Chan*

We examined the storage stability of the sustained releasing recombinant human growth hormone(SR-rhGH) and their therapeutic effect for cardiomyopathia dilatativa patients.

When SR-rhGH had been stored for 2 years, their oxidative index value was 0.11 at –20℃, 0.4 at 4℃, and 0.72 at the room temperature. The encapsulation ratio of the protein into the liposome was 75.2% at –20℃, 67.5% at 4℃ and 56.7% at the room temperature. There was no significant difference in the particle size of SR-rhGH at –20℃ and 4℃. The particle size of SR-rhGH has got 2 times large at the room temperature, and then there was no significant cleavage of the encapsulated recombinant hGH after 2 years.

The cardiosonic indexes and the cardiocontract functions of the patients with cardiomyopathia dilatativa were improved significantly when treated by SR-rhGH with the common therapeutic medicine for the heart failure for 1 month and no patients revisited the clinic within 6 months.

Key words: cardiomyopathia, sustained releasing recombinant human growth hormone, SR-rhGH

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

초산페닐을 리용한 리파제의 활성측정방법

김현석, 김철호, 여충일

위대한 수령 **김일성**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《수학, 물리학, 화학, 생물학 같은 중요한 기초과학부문들을 적극 발전시킴으로써 나라의 과학기술수준을 더욱 높이고 인민경제 여러 분야에서 나서는 과학기술적문제들을 더 잘 풀어나가도록 하여야 하겠습니다.》(《**김일성**전집》 제72권 292페지)

리파제(트리아실글리세롤아실히드롤라제, EC 3.1.1.3)는 기름과 물의 경계면에서 트리글리세리드의 물작용분해를 촉진하는 효소이다.[3] 다른 모든 효소연구와 마찬가지로 리파제연구에서도 가장 선차적으로 나서는 문제는 정확하면서도 신속하고 편리한 활성측정방법을 확립하는것이다.[2]

지금까지 세계적으로 리파제활성을 측정하기 위한 여러가지 방법들이 제기되였다.

전통적인 방법은 적정법인데 이 방법은 올리브기름을 기질로 하고 리파제에 의하여 생성된 기름산을 수산화칼리움으로 산염기적정하는 원리에 기초하고있다.[1] 다음으로 많이 리용되는 대표적인 방법은 분광광도법인데 여기서는 *p*－니트로페닐팔미틴산(*p*-NPP)이나 *p*－니트로페닐스테아린산과 같은 합성기질을 리용한다.[4] 분광광도법은 측정이 편리하고 신속한것으로 하여 널리 적용되고있지만 합성기질의 가격이 비싼것으로 하여 보다 값눅은 기질을 리용하기 위한 연구[2]가 활발히 진행되고있다.

우리는 초산페닐(PA)을 리용하여 리파제활성을 측정하는 새로운 방법을 확립하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

효소로는 *Bacillus subtilis*를 액체배양하여 얻은 리파제(BSLA)[6]를 리용하였다. 활성측정용기질로는 초산페닐(《Macklin》)과 *p*－니트로페닐팔미틴산(*p*-NPP, 《Sigma》)을, 기타 무기시약으로는 페놀(《Wako》), 트리클로로초산(TCA), Na_2CO_3과 폴린시약(《Sigma》)을 리용하였다.

리파제활성측정의 기준적인 방법[7]으로 *p*-NPP분해활성을 측정하였다. 시험관에 기질(2－프로파놀에 푼 *p*-NPP와 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0)을 1：9의 비로 혼합한것) 2.9mL, 효소용액 0.1mL를 넣고 37℃에서 30min동안 반응시킨 후 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.[5] 효소활성 1U는 반응온도 37℃, pH 7.0, *p*－니트로페닐팔미틴산농도 0.5mmol/L에서 1min동안에 1μmol/L의 *p*－니트로페놀을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

PA를 기질로 하는 리파제활성을 다음과 같이 측정하였다.

PA 217mg을 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0) 100mL에 풀어 기질용액(16mmol/L)을 준비하였다. 기질 0.4mL를 시험관에 넣고 37℃에서 10min동안 예열한 다음 적당히 희석한 효소용액 0.1mL를 섞은 후 37℃에서 10min동안 반응시키고 5% TCA용액 0.5mL를 넣

어 반응을 정지시켰다. 우의 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣고 30min동안 발색시킨 다음 750nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

완충용액의 종류와 농도, 기질농도와 효소농도가 활성측정에 미치는 영향을 검토하였으며 단위시간동안의 A_{750}증가량에 기초하여 효소활성을 평가하였다.

결과 및 론의

1) 폴린시약에 의한 페놀 및 초산페닐의 발색

초산페닐은 초산과 페놀의 에스테르화합물로서 리파제에 의하여 분해될 때 페놀이 형성되며 형성된 페놀은 폴린법으로 감도높게 정량할수 있다. 그러나 PA 역시 방향족고리가 있어 폴린시약에 의하여 발색되므로 활성측정에서 오차를 가져올수 있다. 이로부터 먼저 폴린법에 의한 페놀 및 PA검량선을 작성하였다.(그림 1, 2)

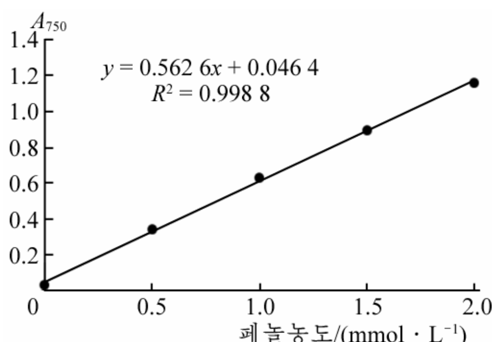


그림 1. 페놀농도에 따르는 A_{750}의 변화

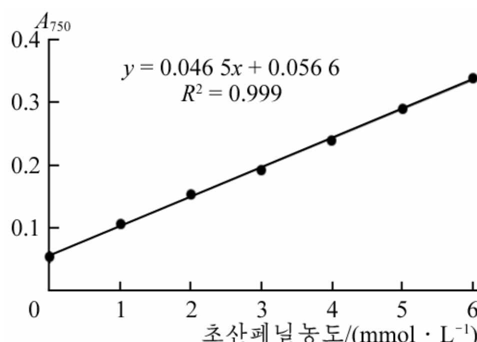


그림 2. PA농도에 따르는 A_{750}의 변화

그림 1과 2에서 보는바와 같이 기질과 생성물이 다같이 폴린시약에 의하여 발색되였다. 그러나 PA에 비하여 페놀의 발색정도는 같은 농도에서 약 12배정도 높았다. 효소반응속도론의 견지에서 기질의 5%이하가 생성물로 넘어갈 때의 조건에서 효소활성을 측정해야 한다는것을 고려해보면 전체적인 흡광도에서 기질변화(감소)에 의한 몫은 생성물에 비하여 0.4%이하밖에 되지 않는다. 이 정도의 오차는 계기오차(1%이하)범위에 들어가므로 그대로 리용할수 있다고 보았다.

2) 완충용액의 영향

많은 경우 완충용액의 종류와 농도가 효소활성측정에 큰 영향을 미친다. pH 7.0의 0.05mol/L 린산완충용액과 0.05mol/L Tris-HCl완충용액에 각각 PA를 16mmol/L 되게 풀고 활성을 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 린산완충용액보다 Tris-HCl완충용액을 리용할 때 A_{750}값이 더 높았다.

다음으로 완충용액의 농도가 효소활성에 미치는 영향을 보았다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 각이한 농도의 Tris-HCl완충용액에 기질을 풀고 리파제의 활성을 측정한 결과 0.05mol/L Tris-HCl완충용액에서 활성이 제일 높았으며 완충용액의 농도가 높을수록 활성이 낮아졌다. *p*-NPP를 기질로 하는 활성측정에서도 많은 경우 Tris-HCl완충용액을 리용하며 그 농도를 0.05mol/L로 정하고있다.[2, 6]

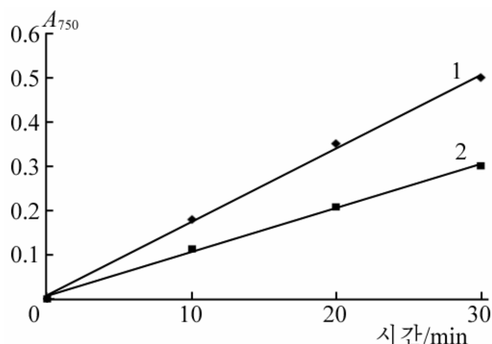


그림 3. PA분해활성측정에 미치는 완충용액종류의 영향
1—Tris-HCl완충용액, 2—린산완충용액

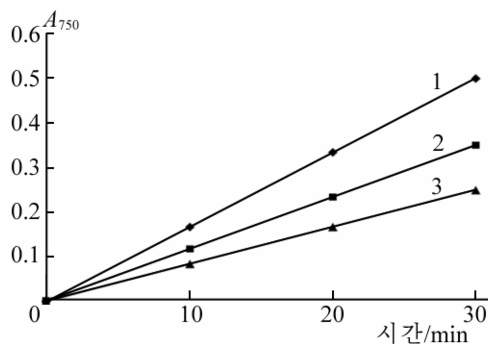


그림 4. PA분해활성측정에 미치는 완충용액농도의 영향
1—3은 각각 0.05, 0.10, 0.20mol/L의 Tris-HCl완충용액

3) 기질농도의 영향

활성측정에서 기질농도를 합리적으로 정하는것이 매우 중요한 문제로 나선다. 그것은 기질량이 충분해야 효소가 자기의 활성을 충분히 나타낼수 있으며 활성측정에서 정확성을 보장할수 있기때문이다.

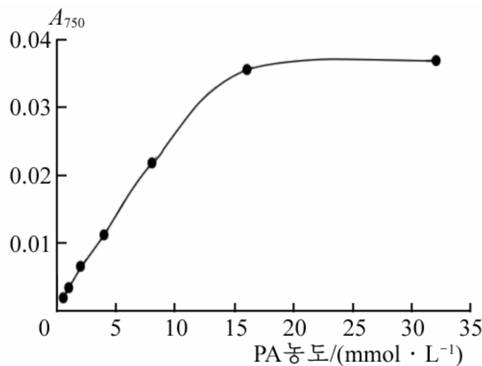


그림 5. PA분해활성측정에 미치는 기질농도의 영향

PA분해활성측정에 미치는 기질농도의 영향은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 기질농도가 16mmol/L이상일 때에는 효소활성이 거의 변화되지 않았다. 기질자체도 폴린시약에 의하여 일정하게 발색되며 기질농도가 높아질수록 대조구의 A_{750}값이 커진다는것을 고려하여 기질농도를 16mmol/L로 정하였다.

4) 효소농도의 영향

p-NPP분해활성으로 2～16U/mL의 각이한 효소용액을 리용하여 반응시간에 따르는 생성물의 농도(A_{750})증가를 관찰하였다. 효소농도와 반응시간에 따르는 반응생성물의 변화는 그림 6과 같다.

그림 6에서 보는바와 같이 효소농도가 높아질수록 초기반응속도구간은 짧아진다. 그러나 *p*-NPP분해활성으로 2～16U/mL의 효소농도에서는 반응시간 10min까지 반응생성물의 량이 선형적으로 증가하였다. 이로부터 효소농도를 *p*-NPP분해활성으로 16U/mL이하 되게 적당히 희석하여 10min동안 반응시키기로 하였다.

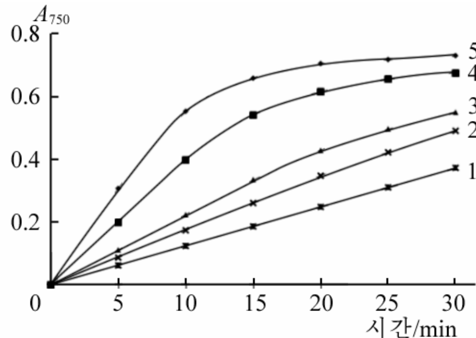


그림 6. 효소농도와 반응시간에 따르는 반응생성물의 변화
1—5는 효소농도가 각각 2, 4, 6, 10, 16U/mL인 경우

5) 정밀도

활성측정방법의 실효성은 그 방법의 정밀도가 얼마나 높은가에 관계된다.

기질(PA 16mmol/L)에 *p*-NPP분해활성으로 4U/mL인 효소를 10, 20, 30min동안 반응시키고 A_{750}을 측정하였다. 반복구를 5개로 하여 상대오차를 계산하는 방식으로 이 활성측정방법의 정밀도를 평가하였다.(그림 7)

분석결과 상대오차는 2%이하였다. 이것은 PA를 리용한 활성측정방법이 매우 정확한 방법이라는것을 보여준다.

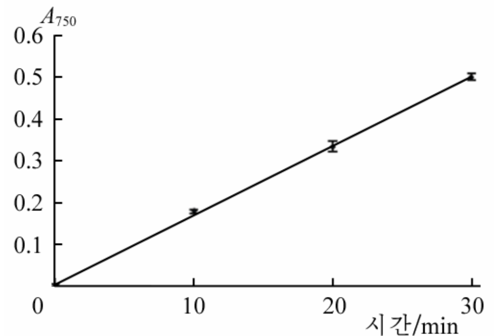


그림 7. PA분해활성측정의 정밀도

6) 활성단위

이상의 결과를 종합하면 PA분해활성에 기초한 리파제활성측정방법을 다음과 같이 확립할수 있다.

16mmol/L의 PA용액(0.05mol/L Tris-HCl완충용액, pH 7.0) 0.4mL를 시험관에 넣고 37℃에서 10min간 예열한 다음 적당히 희석한(*p*-NPP분해활성으로 16U/mL이하) 효소용액 0.1mL를 넣고 10min동안 반응시킨다. 여기에 5% TCA용액 0.5mL를 넣어 반응을 정지시킨다. 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣고 30min동안 발색시킨 다음 750nm에서 흡광도를 측정한다. 대조구에서는 기질용액에 5% TCA용액을 먼저 넣고 효소용액을 넣으며 나머지조작은 실험구에서와 꼭같게 한다. 효소활성 1U는 단위시간동안에 1μmol의 페놀을 생성하는 효소량으로 정의하며 다음의 공식에 따라 효소용액의 활성(U/mL)을 구할수 있다.

$$A_c = \frac{A - A_0}{k} \times \frac{1}{t} \times \frac{V_r}{V_e} \times n$$

여기서 A_c는 효소활성(U/mL), A는 시험구의 A_{750}, A_0은 대조구의 A_{750}, n은 효소용액의 희석배수, t는 효소반응시간(10min), V_e는 효소용액의 체적(0.1mL), V_r는 반응계의 체적(1.0mL), k는 페놀검량선의 회귀결수(그림 1에서 0.562 6)이다.

이 방법으로 측정한 *Bacillus subtilis*리파제의 PA분해활성 1U는 *p*-NPP분해활성 5.5U에 해당된다. 효소에 따라 기질친화성이 각이하며 각이한 기원의 리파제에서 PA분해활성에 대한 *p*-NPP분해활성의 비는 서로 다르게 나타날것이다.

이로부터 PA분해활성을 리파제의 기질친화성연구의 한가지 수단으로 리용할수 있을것이라고 보고있다.

맺 는 말

초산페닐(PA)을 기질로 하는 리파제활성측정방법을 다음과 같이 확립하였다.

217mg의 PA를 0.05mol/L Tris-HCl완충용액(pH 7.0) 100mL에 풀어 기질을 준비한다.

기질 0.4mL에 적당히 희석한 효소용액 0.1mL를 넣고 10min동안 반응시킨 다음 5% TCA용액 0.5mL로 반응을 정지시킨다. 이 반응액 0.2mL에 3.3% Na_2CO_3용액 2.7mL와 폴린시약 0.1mL를 넣어 30min동안 발색시키고 A_{750}을 측정한다. PA분해활성 1U는 1min동안에 1μmol의 페놀을 생성하는 효소량으로 정의한다.

참 고 문 헌

[1] 최원준 등; 효소리용편람, 외국문도서출판사, 168～170, 1984.
[2] M. A. Abd-Elhakeem et al.; American Journal of Analytical Chemistry, 4, 442, 2013.
[3] Ömür Baysal et al.; EC Microbiology, 5, 4, 148, 2017.
[4] Xiaojie Duan et al.; Biotechnol. Lett., 38, 2127, 2016.
[5] Qing Peng et al.; Microbial Cell Factories, 13, 1, 2014.
[6] Haniya Mazhar et al.; Afr. J. Biotechnol., 16, 19, 1106, 2017.
[7] Namita Gupta et al.; Analytical Biochemistry, 311, 1, 98, 2002.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Lipase Activity Assay Method Using Phenyl Acetate

Kim Hyon Sok, Kim Chol Ho and *Yo Chung Il*

We established lipase activity assay method using phenyl acetate as substrate.

217mg of phenyl acetate is added into 100mL of 0.05mol/L Tris-HCl buffer (pH 7.0). 0.1mL of purified enzyme is added into 0.4mL of the reaction mixture and then is incubated at 37°C for 10 minutes. 0.5mL of 0.5% TCA was added to stop the reaction after incubation. Then 0.2mL of reaction mixture is mixed with 2.7mL of 3.3% Na_2CO_3 and is added 0.1mL of folin reagent. After 30 minutes the absorbance at 410nm is measured by spectrophotometer. One Unit of lipase activity is defined as enzyme amount releasing 1μmol of phenol per minute.

Key words: phenyl acetate, lipase, activity assay

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

강제배풍방법을 도입한 PCR장치에서 급랭속도를 높이는데 미치는 몇가지 인자들의 영향

김명룡, 박경범, 박성희

위대한 령도자 **김정일**동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구기관들과 과학자, 기술자들은 우리 나라의 실정에 맞고 나라의 경제발전에 이바지할수 있는 과학기술적문제를 더 많이 풀어야 하겠습니다.》(《**김정일**선집》 증보판 제13권 173폐지)

현재까지 강제배풍방법을 도입한 PCR(폴리메라제련쇄반응)장치에서 급랭속도를 높이는데 미치는 인자들의 영향[1－3]을 장치적인 견지에서 밝힌 연구자료는 보고된것이 없다.

우리는 장치외함의 옆면에 뚫어준 공기구멍들과 뒤면에 설치해주는 선풍기에 의한 강제배풍방법이 급랭시간에 미치는 영향과 급랭속도를 높이기 위한 단열재료의 도입효과 및 반응통선풍기의 기하학적 및 전기적정수값들의 영향 그리고 장치외함안의 온도증가에 미치는 강제배풍방법의 영향에 대한 연구를 하였다.

재료와 방법

강제배풍을 위한 실험재료로는 온도가 0～35℃인 주위공기를 그대로 리용하였으며 실험기구로는 자체로 설계제작한 공기순환방식의 PCR장치를 리용하였다.

예열통에서 발산되는 열에네르기에 의하여 외함안의 공기온도가 주위온도보다 높아져 급랭속도가 떨어지므로 우리는 이 현상을 방지하기 위하여 장치외함의 옆면에 뚫어준 공기구멍들과 뒤면에 설치해주는 선풍기를 련결하는 흐름통로를 리용하여 가열된 공기를 외함밖으로 뽑아버리는 과정을 강제배풍방법이라고 하였다.

장치외함의 량쪽 옆면들에는 면적이 각각 5cm^{2}인 10개의 구멍들을 뚫어주었으며 외함안의 가열된 공기를 밖으로 뽑아버리기 위하여 20L/min의 풍량을 가지는 선풍기를 뒤면에 설치하였다.

반응통안에 설치하는 선풍기는 공기온도가 100℃에서 련속적으로 3h이상 정상동작상태를 유지하여야 하므로 DC 12V를 리용하는 임풀스구동방식의 무솔식전동기를 리용하였으며 날개는 보호덮개가 있는것을 리용하였다.

시험관설치틀은 직경이 10cm이고 두께가 0.8mm인 원형철판에 6mm의 시험관설치구멍과 5mm의 배풍구멍을 뚫어서 리용하였다.

선풍기들의 구동전압과 전류를 측정하기 위하여 수자식회로시험기(《DT830B》)를 리용하였으며 반응통안의 온도는 200℃의 측정한계를 가지는 수은온도계와 한소편처리소자(PIC16F877)를 －55～150℃의 측정한계를 가지는 온도집적소자(LM35 또는 DS18B20)와 결합하여 리용한 전자온도계로 비교측정하였다.

급랭속도를 높이는데 미치는 주요인자들의 영향을 검토하기 위한 모든 실험들은 주위

공기온도가 $T_{공}<10$℃, $T_{공}=20$℃인 온도범위에서 예열통안의 온도가 110～115℃범위, 대기압(1.01×10^{5}pa)조건에서 진행하였다.

실험에서 급랭속도의 변화는 *Taq*폴리메라제효소가 가지고있는 안정성과 활성이 담보되는 유효시간의 견지에서 열변성온도인 $T_{변}=(94\pm1)$℃로부터 대표적인 아닐링온도인 $T_{아}=(55\pm1)$℃까지 낮추는데 걸리는 시간을 급랭시간으로 측정하고 계산하는 방법으로 결정하였다.

그러나 시간에 따르는 온도변화가 일정하지 않으므로 론문에서 소개한 급랭시간은 평균급랭시간을 의미한다.

① 급랭시간에 미치는 반응통과 예열통사이의 열차단을 위한 단열재료의 영향은 일반적인 모직천을 반응통을 구성하는 고정식안통의 안쪽 면과 바깥쪽 면에 따로따로 붙여놓고 측정하였다.

② 급랭시간에 미치는 반응용선풍기의 설치위치의 영향은 날개보호덮개가 있는 조건에서 반응통밑면으로부터 일정한 위치들에 고정하고 측정하였다.

③ 급랭시간에 미치는 반응용선풍기의 기하학적정수값의 영향은 날개의 최대너비가 2.5cm일 때 날개의 길이를 서로 다르게 고정하고 측정하였다.

④ 급랭시간에 미치는 반응용선풍기의 전기적정수값의 영향은 구동전압이 DC 12V일 때 구동전류가 서로 다른 전동기들로 각이하게 설정하고 측정하였다.

⑤ 주위온도변화에 따르는 장치외함안의 온도변화는 반응통의 뚜껑을 닫은 상태와 연 상태에서 각각 측정하였다.

⑥ 급랭시간에 미치는 장치외함의 영향은 주위온도를 $T_{공}<10$℃와 $T_{공}=20$℃인 범위에서 설정하고 측정하였다.

결과 및 론의

1) 급랭시간에 미치는 단열재료의 영향

급랭시간에 미치는 반응통과 예열통사이의 열차단을 위한 단열재료의 영향은 주위온도가 $T_{공}=20$℃에서 두께가 1mm이고 면적이 약 5cm×30cm인 일반모직천을 반응통을 구성하는 고정식안통의 안쪽 면과 바깥쪽 면에 원기둥면을 따라 따로따로 붙여놓고 측정하였다.(그림 1)

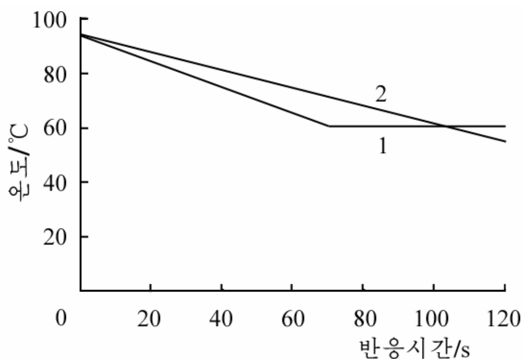


그림 1. 급랭시간에 미치는 단열재료의 영향
1－단열재료가 없는 경우, 2－단열재료가 있는 경우

그림 1에서 보는바와 같이 고정식안통의 안쪽 면과 바깥쪽 면에 단열재료를 씌우지 않았을 때에는 반응통의 온도가 60℃까지밖에 떨어지지 않으며 이 온도까지의 급랭시간은 70s이다. 그러나 단열재료를 씌웠을 때에는 온도가 55℃까지 떨어지기는 하지만 급랭시간이 120s로서 그 차이가 거의 50s로 매우 심하다는것을 보여준다.

이 결과는 우선 반응통이 100℃이상의 항온발열체를 가지고있는 예열통안에 설치되여있다는 조건과 다음으로 반응통의 제작재료가 열전도가 매우 좋은 금속판으로 만들어졌기때문에 예열통과 접하고있는 창문이 닫겨있어도 높은 온도로 예열된 에네르기가 항상 반응통을 구성하고있는 열전도가 좋은 금속판쪽으로 전달되는데 그 원인이 있다고 론의할수 있다.

또한 시험관이 설치되는 고정식안통이 예열통안의 가열된 공기와 직접 닿아있지 않고 승강식바깥통과 1mm정도의 간격을 두고있지만 이것은 예열된 에네르기가 고정식안통안의 공기를 덥히기에는 충분하므로 급랭시간보장에 결정적인 영향을 준다는데 그 원인이 있다고 론의할수 있다.

따라서 급랭시간을 단축하기 위하여서는 반드시 고정식안통의 안쪽 면과 바깥쪽 면에 단열재료를 따로따로 씌워주어야 하며 또한 예열통을 구성하는 전체 바깥면에도 단열재료를 씌워주는것이 급랭효과를 더 높이기 위해 효과적이라는 결론을 찾을수 있다.

2) 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 설치위치의 영향

주위온도가 $T_{공}$=20℃에서 날개보호덮개가 있는 경우 반응통밑면으로부터 공기창문들과 겹치지 않는 4, 5, 6cm인 위치에 선풍기를 설치하고 급랭시간변화를 측정하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 반응통밑면으로부터 4cm인 위치에 선풍기를 설치할 때 반응통의 온도가 60℃까지밖에 떨어지지 않으며 이 경우의 급랭시간은 58s이다. 그러나 반응통밑면으로부터 5, 6cm인 위치에 선풍기를 설치할 때에는 같은 온도까지 떨어지는 급랭시간이 65, 70s로서 그 차이가 7, 12s이며 설치위치가 낮을수록 상대적으로 급랭시간이 짧아진다는것을 알수 있다.

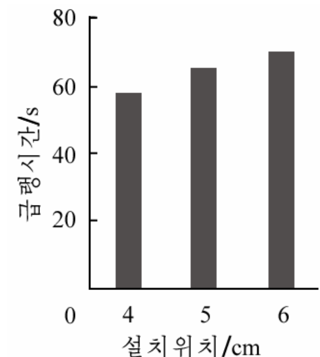


그림 2. 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 설치 위치의 영향

이 결과는 반응통선풍기의 설치위치를 반응통의 밑면으로부터 멀리 정할수록 예열통과는 상대적으로 가까와지고 예압통의 창문과 멀어지므로 랭각용주위공기의 흐름통로가 길어지기때문에 온도가 높아지는데 그 원인이 있다고 론의할수 있다.

따라서 급랭시간을 단축하기 위해 고정식안통에 설치되는 합리적인 반응통선풍기의 위치는 반응통밑면으로부터 예열통과 예압통의 공기창문들과 겹치지 않으면서도 제일 낮은 위치인 4cm인 높이에 고정해주는것이 효과적이라고 본다.

3) 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 날개길이의 영향

주위온도 $T_{공}$=20℃, 설치위치를 4cm로 고정한 상태에서 선풍기날개의 길이를 8, 9cm로 변화시키면서 급랭시간변화를 측정하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 날개길이가 9cm인 선풍기를 리용할 때에도 반응통의 온도가 60℃까지밖에 떨어지지 않으며 이 경우의 급랭시간은 55s이다. 그러나 날개길이가 8cm인 선풍기를 리용할 때에는 같은 온도까지 떨어지는 급랭시간이 65s로서 그 차이가 거의 10s로 매우 심하며 날개길이가 클수록 상대적으로 급랭시간이 더 짧아진다는것을 보여준다.

이로부터 반응통의 직경과 거의 일치하는 9cm길이의 날개를 리용하면 최대공기흐름을 보장할수 있기때문에 급랭시간을 단축하는데 효과적이라고 본다.

4) 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 전기적정수값의 영향

주위온도 $T_{공}$=20℃, 반응통선풍기의 날개길이를 9cm로 고정한 상태에서 구동전압이 DC12V일 때 전동기의 구동전류를 0.15, 0.25, 0.6A로 각이하게 설정하고 급랭시간변화를 측정하였다.(그림 4)

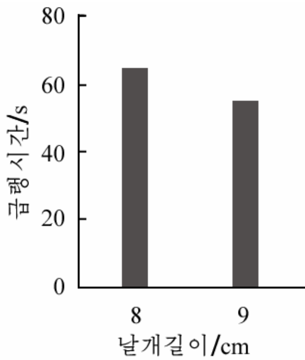


그림 3. 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 날개길이의 영향

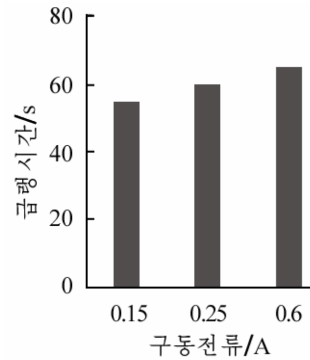


그림 4. 급랭시간에 미치는 반응통선풍기의 전기적정수값의 영향

그림 4에서 보는바와 같이 구동전류가 0.6A인 선풍기를 설치할 때 반응통의 온도가 60℃까지밖에 떨어지지 않지만 이 온도까지의 급랭시간은 55s이다. 그러나 구동전류가 0.25, 0.15A인 선풍기를 설치할 때에는 같은 온도까지 떨어지는 급랭시간이 60, 65s로서 그 차이가 거의 5, 10s로 심하며 구동전류가 클수록 상대적으로 급랭시간이 짧아진다는것을 보여준다.

이로부터 반응통선풍기의 날개길이가 큰 조건에서 구동전류가 클수록 회전속도가 커지고 풍량이 많아지므로 단위시간당 보다 많은 주위공기를 리용하여 반응통안에 대한 랭각작용을 한다는것을 알수 있다.

따라서 급랭시간을 단축하기 위한 합리적인 반응통선풍기의 전기적정수와 치수는 반응통의 직경에 가까운 날개길이를 가진 선풍기를 선정하는 조건에서 구동전류가 큰 전동기를 리용하는것이 효과적이라고 본다.

5) 장치외함안의 온도증가에 미치는 강제배풍방법의 영향

실험장치의 설계와 제작에서 장치외함은 반드시 보장되여야 한다.

그런데 장치외함이 있는 경우 PCR장치의 내부에 있는 예열통의 열에네르기발산에 의하여 장치외함안의 온도는 올라가게 되며 이 영향은 주위온도가 높아질수록 더 심해진다.

실험에서는 주위온도변화에 따르는 장치외함안의 온도변화를 반응통의 뚜껑을 닫은 상태와 연 상태에서 측정하였다.(그림 5)

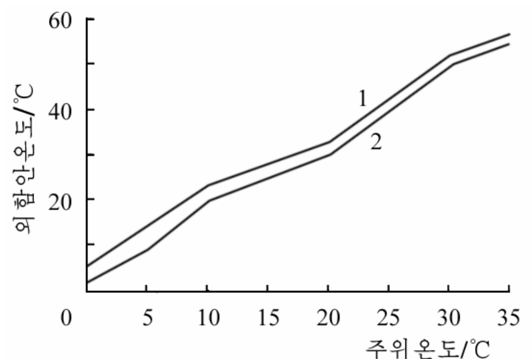


그림 5. 주위온도변화에 따르는 장치외함안의 온도변화
1－뚜껑을 닫았을 때, 2－뚜껑을 열었을 때

반응통의 뚜껑을 닫은 상태에서의 온도값은 예열전원을 넣은 후 예열통의 온도가 충분히 110～115℃까지 도달하는데 필요한 60s후에 측정하

였다. 또한 반응통의 뚜껑을 연 상태에서의 온도값은 우와 같은 조건에서 3s후에 측정하였다.

그림 5에서 보는바와 같이 장치외함안의 온도는 항상 주위온도보다 높다는것을 알수 있다. 실례로 주위온도가 10℃인 경우 외함안의 온도는 20℃로서 10℃나 더 높으며 주위온도가 35℃인 경우에는 외함안의 온도가 57℃로서 22℃나 더 높았다.

그 원인은 공기구멍을 통하여 들어오는 주위공기가 예열통의 열에네르기발산에 의해 보충적으로 가열될뿐아니라 장치외함바깥과 련결되는 통로가 없기때문에 증가된다고 볼수 있다.

이 실험결과로부터 강제배풍방법에서는 랭각구멍을 통하여 들어오는 주위공기의 흐름속도와 량에 비하여 예열통의 열에네르기발산에 의하여 보충적으로 가열되는 공기량이 더 많기때문에 장치외함바깥과 련결되는 통로인 반응통의 뚜껑이 열린다고 해도 외함안의 온도를 2～3℃정도밖에 떨구지 못한다는것을 알수 있다.

6) 급랭시간에 미치는 장치외함의 영향

앞에서 얻은 합리적인 조건들을 보장하면서 급랭시간에 미치는 주위온도의 영향을 $T_{공}$=8℃와 $T_{공}$=20℃에서 장치외함이 있는 경우와 없는 경우를 따로따로 설정하고 측정하였다.

두 경우에 대하여 직관적인 비교를 하기 위하여 2개의 그라프에 대한 가로축과 세로축의 자리표를 서로 일치시켜 시간－온도변화관계그라프를 작성하였다.(그림 6)

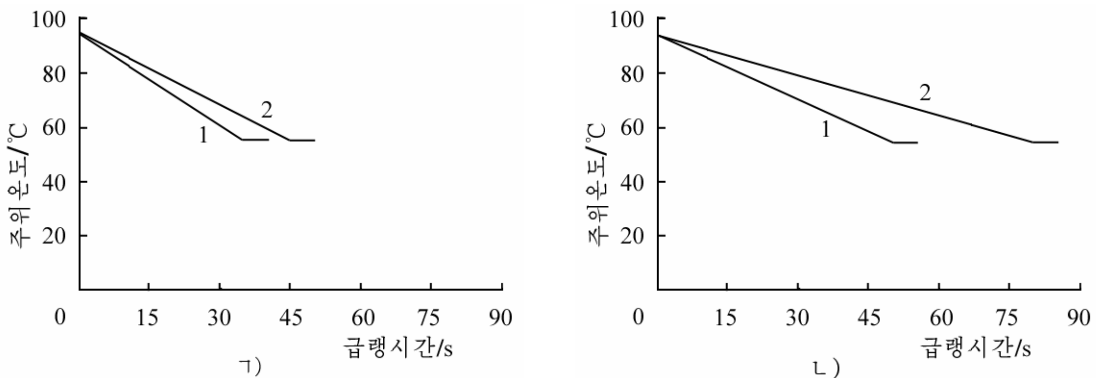


그림 6. 주위온도가 급랭시간에 미치는 영향

ㄱ) $T_{공}$=8℃, ㄴ) $T_{공}$=20℃; 1－외함이 없는 경우, 2－외함이 있는 경우

그림 6에 표시된 실험결과를 론의하면 다음과 같다.

주위온도가 $T_{공}$=8℃일 때 장치외함이 있는 경우와 없는 경우의 급랭시간차이는 약 10s정도이며 ±5s범위내에서는 합리적인 급랭시간범위에 겨우 들어간다. 이것은 주위온도가 낮을 때에는 모든 경우에 다 급랭시간보장이 가능하며 합리적인 급랭시간범위에 가깝게 접근한다는것을 보여준다. 다시말하여 주위공기의 온도가 낮을 때에도 장치외함안의 온도가 20℃로 증가되여 주위온도보다 10℃정도 더 높아지지만 반응통의 온도를 합리적인 급랭시간범위로 낮추는데는 강제흐름통로인 공기구멍들을 통해서도 실현할수 있다는것을 보여준다.

그러나 주위온도가 $T_{공}$=20℃일 때 장치외함이 있는 경우와 없는 경우의 급랭시간의 차이는 약 30s정도이지만 두 경우 합리적인 급랭시간범위(35±5℃)에 들어가지 못한다. 이것은

주위온도가 아닐링온도보다 낮기때문에 반응통의 랭각이 원리적으로는 가능하지만 예열통의 온도가 매우 높기때문에 초래되는 결과라고 볼수 있다. 즉 장치외함걸면에 아무리 많은 구멍을 뚫어주어 주위공기가 강제적으로 흐를수 있게 만들어주었다고 해도 공기조종블로크안에 있는 예열통이 100℃이상의 항온발열체를 가지고있기때문에 장치외함안의 평균온도는 30℃이상으로서 주위온도보다 10℃이상 더 높아지게 되며 따라서 합리적인 급랭시간보장에 결정적인 지장을 준다는것을 보여준다.

이와 같은 영향은 주위온도가 높아질수록 더 크게 작용하므로 강제배풍방법에서 장치외함은 합리적인 급랭시간보장을 위한 공기흐름에 큰 지장으로 된다는것을 알수 있다.

이로부터 우리는 장치외함이 있는 경우 강제배풍방법을 도입하여 설계제작된 PCR장치를 리용하려면 주위공기의 온도가 $T_{공}$<10℃인 동작조건을 설정하여야만 합리적인 급랭시간을 보장할수 있다는 결론을 얻게 되였다.

맺 는 말

단열재료를 반응통내부와 예열통의 바깥면에 붙여준 경우 합리적인 급랭시간보장을 위하여 필요한 반응통선풍기의 정수값들은 설치위치 4cm, 날개길이 9cm, 구동전류 0.6A이다.

강제배풍방식에서 장치외함이 있는 경우 합리적인 급랭시간보장을 위한 필요한 주위공기의 온도범위는 $T_{공}$<10℃이다.

참 고 문 헌

[1] R. P. Wilkes et al.; Journal of Virological Methods, 220, 35, 2015.

[2] J. Hodgetts et al.; Plant Pathology, 64, 559, 2015.

[3] 福原健志; 日本国特許(JP), 特開2003-101974(P2003-101974A), 2003.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

The Effect of Several Factors on Increasing Rapid Cooling Speed in Polymerase Chain Reaction Device of Forced-Ventilation Method

Kim Myong Ryong, *Pak Kyong Bom* and *Pak Song Hui*

When the adiabatic material was attached, the electric parameters of reactive box fan, a fixing position is 4cm, the fan is 9cm long and the intensity of drivable electric current is 0.6A. Range of vicinity temperature(T_{air}) is small than 10℃ in outer box using forced-ventilation method.

Key word: PCR

각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자의 특성

류권일, 리진혁, 고성국, 김별

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《풍력과 조수력, 생물질과 태양에네르기에 의한 전력생산을 늘이며 자연에네르기의 리용범위를 계속 확대하여야 합니다.》

나노TiO_2막은 페로브스카이트형태양빛전지에서 색소를 흡착하고 색소에서 려기된 전자를 분리하여 외부회로로 수송하는 기능을 수행한다.[6]

현재 여러가지 방법으로 나노TiO_2립자를 제조하고있지만 제조된 나노TiO_2립자들의 빛전기적특성에서는 차이가 있다.

우리는 대표적인 4가지 방법으로 나노TiO_2립자를 합성하고 페로브스카이트형태양빛전지에 적합한 나노TiO_2립자합성방법을 확립하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

나노TiO_2결정을 만드는데 분석순인 티탄이소프로폭시드(《Aldrich》), 빙초산, 질산, 이소프로필알콜, 무수에틸알콜을 리용하였다.

파스타제조에는 분석순인 에틸섬유소(《Aldrich》), 테르피네올, 아세틸아세톤을 리용하였다.

전도성유리로는 불소첨가투명전도성유리(FTO, 15Ω/cm^2)를 리용하였다.

수열처리용가압반응기로는 티탄고압반응기를 리용하였다.

나노TiO_2립자의 크기와 결정성은 X선회절분석기를 리용하여 측정하였다.

나노TiO_2립자의 크기는 주사전자현미경(《JSM-6610A》)을 리용하여 측정하였다.

TiO_2막두께측정과 표면분석은 표면분석기(《Micro XAM-100》)를 리용하여 진행하였다.

전지의 열린회로전압과 닫긴회로전류세기는 수자식회로시험기(《DT-830B》)로 측정하였다.

나노TiO_2립자는 선행방법[1－4]에 기초하여 각이한 방법으로 제조하였다.

나노TiO_2파스타는 각이한 방법으로 제조한 0.3g의 나노TiO_2립자, 0.15g의 에틸섬유소, 100μL의 아세틸아세톤, 1.5mL의 에틸알콜, 1.2mL의 테르피네올을 혼합하여 행성식볼분쇄기(350r/min)에서 4h동안 처리하여 제조하였다.

단층나노TiO_2막의 제조방법은 다음과 같다.

세척한 전도성투명유리(FTO)에 45μm두께의 접착테프(《Scotch》)를 1cm×1cm면이 드러나게 붙이고 제조한 나노TiO_2파스타를 칼도포법으로 피복하여 TiO_2겔막을 형성시켰다. 피복한 TiO_2겔막을 80℃에서 30min동안 건조시키고 소결로에 넣어 500℃에서 30min동안 열처리하여 단층막을 제조하였다.

나노TiO_2파스타를 투명전도성유리우에 채인쇄법으로 피복하고 이것을 80℃에서

30min동안 건조시킨 다음 450℃에서 30min동안 소결하고 식힌 후 XRD와 SEM의 측정상으로 나노TiO_2립자의 크기를 결정하였다.

전지는 선행방법[7]에 기초하여 구성하였다.

결과 및 론의

1) 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자의 특성

대표적인 4가지 방법으로 나노TiO_2립자를 합성하고 파스타를 제조하여 전도성유리우에 칼도포법으로 피복한 다음 합성한 나노TiO_2립자의 결정성과 립자크기를 보기 위하여 XRD와 SEM측정을 진행하였다.

방법 1에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상은 그림 1과 같다.

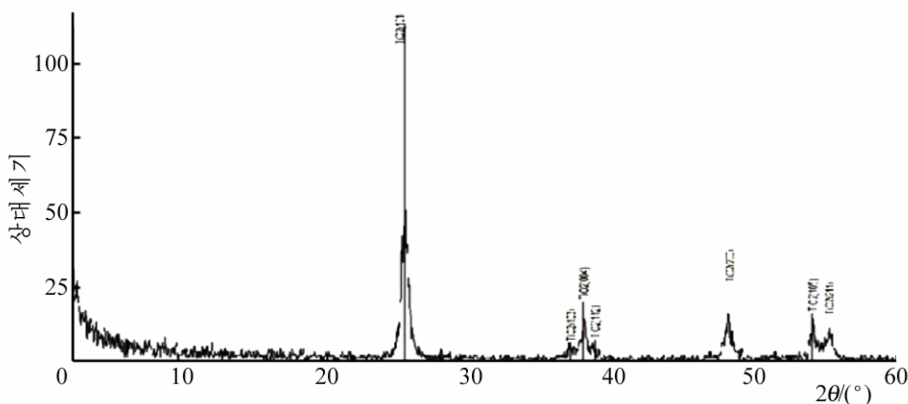


그림 1. 방법1에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상

그림 1에서 보는바와 같이 2θ가 25.39, 37.81, 48.15, 54.00°인 위치에서 특성봉우리가 나타났으며 특히 결정형예추석의 전형적인 봉우리인 25.39°(101면)에서 높은 세기의 봉우리가 나타났다.[5] 일반적으로 X선회절상에서 봉우리가 높으면 립자의 크기가 크며 낮을수록 립자의 크기는 작다.

방법 1로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과는 표 1과 같다.

표 1. 방법1로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과

No.	2θ/(°)	면사이거리(d) /nm	세기	반폭값	립자크기 /nm
1	25.39(3)	0.350 5(4)	31(6)	0.57(2)	14.9(5)
2	37.81(7)	0.237 7(4)	5(2)	0.79(10)	11.1(14)
3	48.15(4)	0.188 9(13)	9(3)	0.48(5)	18.9(19)
4	54.00(6)	0.169 6(18)	7(3)	0.34(12)	21.6(96)
5	55.35(5)	0.165 8(14)	6(2)	0.43(9)	21.8(43)

표 1에서 보는바와 같이 립자의 크기는 14～22nm이며 모든 2θ에서 립자의 크기가 각이한것은 립자의 형태가 구형이 아니라 일정한 각면을 가진 피라미드형이기때문이라고 볼수 있다.

방법 2에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상은 그림 2와 같다.

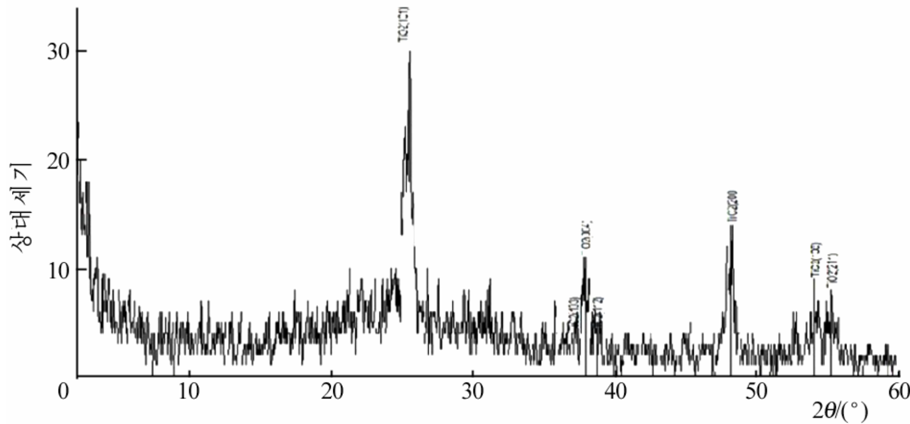


그림 2. 방법 2에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상

그림 2에서 보는바와 같이 2θ가 25.52, 37.88, 47, 94, 54.21°인 위치에서 특성봉우리가 나타났는데 이것은 예추석봉우리에 해당된다. 따라서 합성된 나노TiO_2립자가 결정형예추석이며 봉우리의 세기가 방법 1에 따라 제조한 립자보다 낮은것으로 보아 립자의 크기가 작다는것을 알수 있다.

방법 2로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과는 표 2와 같다.

표 2. 방법 2로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과

No	2θ/(°)	면사이거리(d) /nm	세기	반폭값	립자크기 /nm
1	25.52(8)	0.348 7(11)	13(4)	0.74(11)	11.6(17)
2	37.888 9	0.237 2	16.820 586	0.735 287	11.930 7
3	47.94(11)	0.189 6(4)	5(2)	0.63(13)	14.3(29)
4	54.211 3	0.169 0	7.763 927	0.735 287	12.676 8
5	55.478 5	0.165 5	7.008 868	0.735 287	12.749 7

표 2에서 보는바와 같이 립자의 크기는 11～15nm이며 모든 2θ에서 립자의 크기가 크게 차이나지 않기때문에 립자의 형태가 거의 구형이라고 볼수 있다.

방법 3에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상은 그림 3과 같다.

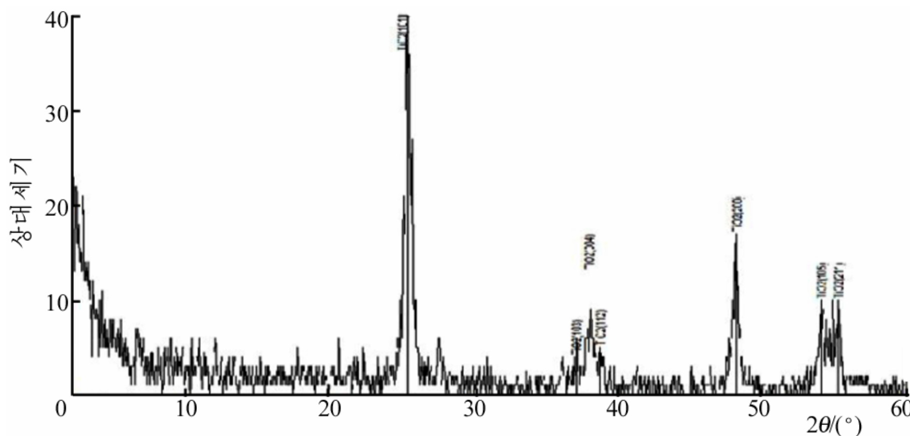


그림 3. 방법 3에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상

그림 3에서 보는바와 같이 2θ가 25.36, 37.92, 48.29, 54.29°인 위치에서 특성봉우리가 나타났는데 이것은 전형적인 예추석의 봉우리에 해당된다. 또한 봉우리의 세기가 낮은것으로 보아 립자크기가 작다는것을 알수 있다.

방법 3으로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과는 표 3과 같다.

표 3. 방법 3으로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과

No	2θ/(°)	면사이거리(d)/nm	세기	반폭값	립자크기/nm
1	25.36(4)	0.351 0(5)	23(5)	0.53(3)	15.9(9)
2	37.92(5)	0.237 1(3)	3.2(18)	0.85(11)	10.3(13)
3	48.29(7)	0.188 3(2)	7(3)	0.50(8)	18.3(31)
4	54.29(4)	0.168 8(12)	3.5(19)	1.38(12)	6.7(6)

표 3에서 보는바와 같이 립자의 크기는 15～19nm이며 모든 2θ에서 립자의 크기가 차이나므로 립자의 형태가 피라미드형이라고 볼수 있다.

방법 4에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상은 그림 4와 같다.

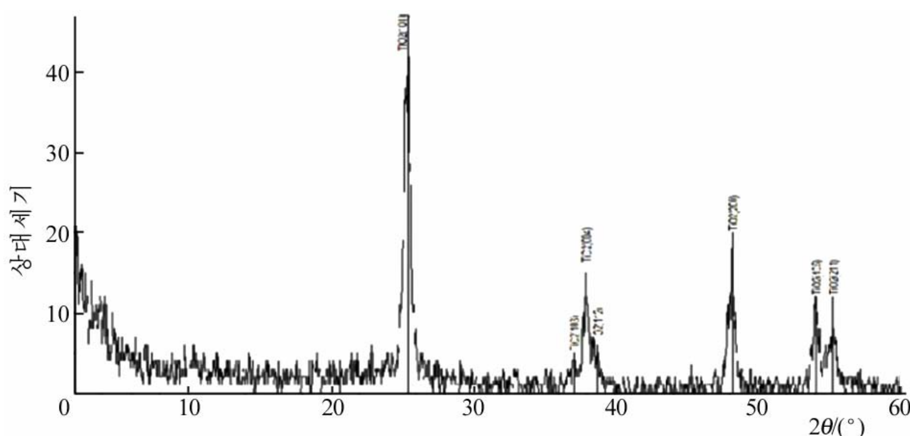


그림 4. 방법 4에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 XRD분석상

그림 4에서 보는바와 같이 2θ가 25.37, 37.83, 48.10, 53.97°인 위치에서 특성봉우리가 나타났는데 이것은 제조한 나노TiO_2립자가 결정형예추석이라는것을 보여준다. 또한 봉우리의 세기가 낮은것으로 보아 립자크기가 작다는것을 알수 있다.

방법 4로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과는 표 4와 같다.

표 4. 방법 4로 제조한 나노TiO_2립자의 X선회절스펙트르분석결과

No	2θ/(°)	면사이거리(d)/nm	세기	반폭값	립자크기/nm
1	25.37(4)	0.350 8(5)	25(5)	0.55(3)	15.5(9)
2	37.83(2)	0.237 6(15)	5(2)	0.71(6)	12.4(11)
3	48.10(3)	0.189 0(10)	7(3)	0.57(4)	16.0(11)
4	53.97(5)	0.169 7(14)	3.0(17)	1.651(6)	5.6(6)

표 4에서 보는바와 같이 립자크기는 12～16nm정도이며 001면과 004, 200면이 발달되고 피라미드형인 예추석이라는것을 알수 있다.

다음 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자를 리용하여 나노TiO_2막을 전도성유리우에 피복하고 450℃에서 소결한 다음 그 결면구조를 SEM으로 관찰하였다.(그림 5)

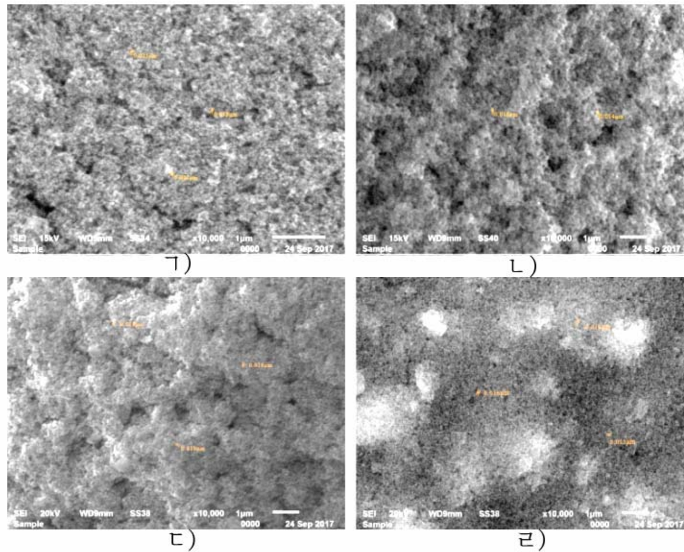


그림 5. 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자의 SEM상
ㄱ)—ㄹ)는 방법 1—4로 각각 제조한것임

그림 5에서 보는바와 같이 방법 1에 따라 제조한 나노TiO_2립자의 크기는 18～23nm, 방법 2에 따라 제조한 립자의 크기는 14～16nm, 방법 3에 따라 제조한 립자의 크기는 16～19nm, 방법 4에 따라 제조한 립자의 크기는 13～16nm정도였다. X선회절스펙트르분석자료와 측정값이 약간 차이나지만 합성방법에 따라 립자크기가 차이난다는것은 명백하다.

2) 나노TiO_2막의 표면상과 빛전기적특성

각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2막의 표면상 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자를 리용하여 제조한 단층나노TiO_2막의 표면상을 표면분석기를 리용하여 분석하였다.

방법 1로 제조한 나노TiO_2막의 3차원사진에서는 막에 나노립자들의 무지들이 일부 있었지만 방법 2에 따라 제조한 막의 3차원사진에서는 막이 비교적 고르로왔다. 또한 방법 3으로 제조한 나노TiO_2막의 3차원사진에서 보면 막이 제일 고르로왔고 방법 4로 제조한 나노TiO_2막의 3차원사진에서 보면 막의 굴곡이 대단히 심했다.

결과적으로 방법 1—3으로 제조한 나노TiO_2막의 표면상이 비교적 균일하고 방법 4로 제조한 막의 표면이 제일 거칠다는것을 알수 있다.

각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2막의 빛전기적특성 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자를 리용하여 나노TiO_2막(대략 12μm)을 제조하고 전지를 구성한 다음 전지의 빛전기적특성을 검토하였다.(표 5)

표 5. 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2막으로 만든 전지의 빛전기적특성

제조방법	J_{SC}/(mA·cm^{-2})	V_{OC}/V	FF	η/%
1	20.4±0.2	0.89±0.01	0.64±0.01	11.62±0.02
2	16.6±0.1	0.87±0.03	0.63±0.02	9.10±0.02
3	16.4±0.2	0.89±0.02	0.62±0.01	9.05±0.02
4	12.4±0.1	0.73±0.01	0.52±0.03	4.70±0.02

표 5에서 보는바와 같이 각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2막으로 만든 전지의 빛전기적특성은 방법 1로 제조한 막으로 구성한 빛전지에서 닫긴회로전류세기 20.4mA/cm^2, 열린회로전압 0.89V, 충만인자 0.64, 빛전기변환효률 11.62%로서 제일 좋았다.

방법 1로 제조한 나노TiO_2막을 리용한 전지에서 닫긴회로전류세기가 커져 빛전기변환효률이 높아졌는데 그것은 려기된 전자의 수명이 길어진것과 관련된다고 볼수 있다.

맺 는 말

각이한 방법으로 제조한 나노TiO_2립자는 모두 예추석형이지만 크기는 서로 각이하며 나노TiO_2막의 표면은 방법 4로 제조한 막에서 제일 거칠다.

방법 1로 제조한 나노TiO_2립자로 만든 전지의 빛전기변환효률은 11.62%로서 제일 높았다.

참 고 문 헌

[1] Seigo Ito et al.; Thin Solid Films, 516, 4613, 2008.

[2] Yeji Lee et al.; Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 16, 609, 2010.

[3] Sancun Hao et al.; 15th International Photovoltaic Science & Engineering Conference, Shanghai China, 1297～1298, 2005.

[4] Li Yang et al.; Solar Energy, 81, 717, 2007.

[5] C. J. Barbe et al.; J. Am. Ceram. Soc., 80, 12, 3157, 1997.

[6] K. Wojciechowski et al.; Energy & Environmental Science, 7, 1142, 2014.

[7] Liao Xu et al.; Organic Electronics, 45, 131, 2017.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Properties of Nano-TiO_2 Particles Manufactured by the Different Methods

Ryu Kwon Il, Ri Jin Hyok, Ko Song Guk and *Kim Pyol*

All the nano-TiO_2 particles manufactured by the different methods were anatases, but their sizes were different with each other. The surface of nano-TiO_2 film manufactured by the method 4 was the roughest.

The photo-electricity conversion efficiency of the solar cell with the nano-TiO_2 particles manufactured by the method 1 was the highest as 11.62%.

Key words: perovskite solar cell, nano-TiO_2 particle

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

완전채인쇄가능한 태양빛전지제작용 페로브스카이트결정의 형성에 미치는 티오뇨소의 영향

차경진, 고성국, 류권일, 김별, 리진혁

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학연구부문에서는 에네르기문제해결에 힘을 집중하여야 합니다.》

태양에네르기를 보다 적은 원가로 그리고 높은 효률로 개발리용하기 위한 연구가 광범히 진행되는 과정에 페로브스카이트형태양빛전지가 개발되여 많은 연구자들의 관심을 끌고있다. 특히 유기금속트리할로겐화물형페로브스카이트를 리용한 페로브스카이트형태양빛전지는 개발당시 효률이 3.8%[3]였으나 그로부터 몇년후에는 22.1%[4]를 돌파하였다.

전하재결합률을 줄이기 위해서는 페로브스카이트막의 결함을 줄이는것이 중요하다. 페로브스카이트막의 결함을 줄이기 위하여 리용되는 방법으로서는 용액공학법(solution engineering)[5, 6], 성분공학법(compositional engineering)[7], 첨가공학법(additive engineering)[8, 9, 11], 계면공학법(interfacial engineering)[10]이 있다. 전형적인 페로브스카이트형태양빛전지에 이러한 방법들을 적용하여 전지의 효률을 높인 연구자료들은 많이 제기되였지만 3층단기판탄소대극태양빛전지에서 제기된 자료는 그리 많지 못하다. 그것은 3층막우에 색소를 직접침적시키는것으로 하여 결정형성과정이 다른 형태의 전지들에 비하여 많은 제한을 받는것과 관련된다. 최근 일부 연구자들은 분자가교제를 리용하여 페로브스카이트의 안정성과 빛전기변환효률을 높였다.[1, 2] 티오뇨소는 1개의 탄소원자에 2개의 아민기와 1개의 류황기가 결합된 물질로서 이 3개의 기능단은 모두 수소결합을 형성할수 있으며 또 금속원자(Pb)에 배위될수 있다. 그러므로 우리는 티오뇨소 역시 분자가교제로 작용하여 태양빛전지의 효률을 높일수 있다고 보았다.

우리는 티오뇨소를 페로브스카이트색소에 혼합하여 1단계법으로 3층막구조에 방울침적시켰을 때 태양빛전지효률에 미치는 영향을 검토하였다.

재료와 방법

1) 시약

실험에는 요드화연(《SIGMA》), 염화연(《SIGMA》), 메틸아민(《SIGMA》), 요드화수소(《SIGMA》), DMF(《SIGMA》), $TiCl_4$(《SIGMA》)을 리용하였다.

2) 전지제작방법

먼저 FTO유리에 탄산가스레이자로 분리선을 내고 세척제, 탈이온수, 에틸알콜을 리용하여 각각 15min씩 초음파세척을 진행하였다. 유리를 건조시킨 다음 접착테프로 치밀층을 형성하기 위한 부위만 남겨두고 가리우고 0.2mol/L $TiCl_4$용액(온도 70℃)에서 60min동안 처리하였다. 다음 탈이온수로 유리를 깨끗이 세척하고 방안온도에서 건조시켰다. 메조다공

성TiO_2층은 TiO_2파스타원액을 테르펜으로 3배 희석한것을 채인쇄방법으로 입혀 형성시켰다. 다음 이것을 450℃에서 30min동안 소결하였다. ZrO_2파스타를 채인쇄하여 ZrO_2층을 형성시킨 다음 그것을 500℃에서 30min동안 소결하였다. 탄소(C)대극은 탄소파스타를 채인쇄한 다음 400℃에서 30min동안 소결하여 형성시켰다. 요드화연 0.345g, 염화연 0.069g, 요드화메틸아민 0.159g을 1mL의 DMF용액에 풀고 여기에 티오뇨소를 각각 0, 5, 10, 15, 20mg을 풀어서 색소용액계렬을 만들었다. 제조한 색소용액을 90℃에서 2μL 취하여 칼도포하는 방법으로 색소를 입혔다. 색소를 입힌 다음 전구체용액이 페로브스카이트로 완전히 넘어가도록 하기 위하여 100℃에서 20min동안 열처리하였다.

3) 특성평가방법

UV흡수스펙트르는 앞에서 제조한 페로브스카이트용액을 FTO유리우에 칼도포법으로 입히고 자외가시분광광도계(《DU 730》)로 측정하였다.

페로브스카이트막의 형태는 주사전자현미경(《JS-6610A》)으로 조사하였다. 시료는 FTO유리우에 치밀층과 TiO_2, ZrO_2막을 입히고 소결한 다음 그우에 색소를 칼도포하여 만들었다. 페로브스카이트막의 결정구조는 X선회절분석기(40mA, 40kV, CuKα선, λ=1.540 51Å)를 리용하여 확인하였다. 전지의 전기화학적임피단스스펙트르는 전기화학측정장치(《CHI604E》)를 리용하여 주파수령역 1～10^6Hz, 어둠조건, 0.8V의 편의전압에서 진행하였다. 빛전지의 전류세기－전압곡선은 AM 1.5의 빛복사조건에서 전기화학측정장치(《CHI604E》)를 리용하여 측정하였으며 측정활성면적은 0.01cm^2로 하였다. 빛발광은 형광분석기(《RF-5000》)로 측정하였다. 려기빛파장은 500nm로 하였다.

결과 및 론의

그림 1의 ㄱ)와 ㄴ)에 우리가 리용한 완전인쇄가능한 구멍전달물질이 없는 탄소대극단기판태양빛전지의 구조를 보여주었다. 치밀층은 $TiCl_4$에 의한 CBD방법에 기초하여 입혔다. 나머지층들은 채인쇄법으로 입혔다.(그림 1의 ㄴ)) 장치에서 매 층들의 에네르기수준을 그림 1의 ㄷ)에 보여주었다. 페로브스카이트의 전도띠로부터 TiO_2전도띠에로 전자가 효과적으로 추출될수 있으며 페로브스카이트의 값전자띠로부터 탄소에로 구멍이 수집될수 있다. 이 전지에서 색소는 탄소층에 직접 침적되기때문에 TiO_2/페로브스카이트사이의 접촉과 탄소/페로브스카이트사이의 접촉이 전지의 효률에 큰 영향을 미친다.

페로브스카이트막의 특성을 검토하기 위하여 FTO(혹은 FTO/c-TiO_2, FTO/c-TiO_2/m-TiO_2/ZrO_2)에 티오뇨소가 각이한 농도로 들어있는 페로브스카이트전구체용액을 칼도포한 다음 100℃에서 20min동안 열처리하여 페로브스카이트막을 형성시켰다.

칼도포법으로 FTO유리우에 형성시킨 페로브스카이트막을 보면 누런색의 전구체용액은 100℃에서 20min만에 모두 검은 밤색으로 변화되였다. 이것은 전구체용액이 페로브스카이트결정으로 완전히 전환되였다는것을 말해준다.

티오뇨소를 첨가하였을 때 막의 광학적특성이 어떻게 변화되는가를 UV흡수스펙트르분석으로 평가하였다.(그림 2) 시료들은 모두 FTO유리우에 전구체용액을 칼도포하여 준비하였다. 티오뇨소를 첨가하였을 때 흡수스펙트르는 크게 변화되였다. 티오뇨소를 첨가(5,

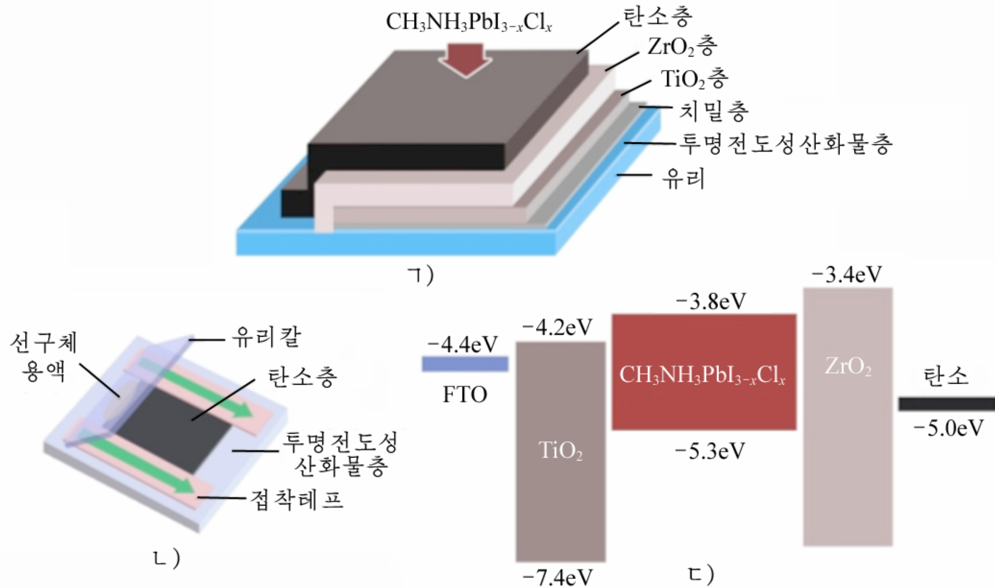


그림 1. 완전인쇄가능한 구멍전달물질이 없는 탄소대극단기판태양빛전지의 구조(ㄱ))와 페로브스카이트전구체용액의 침적방법(ㄴ)), 장치의 에네르기준위도해(ㄷ))

10mg)하였을 때 긴파장쪽에서의 흡광도는 대조보다 높아졌지만 짧은파장쪽에서는 낮아졌다. 그러나 티오뇨소를 15, 20mg 첨가하였을 때에는 짧은파장쪽에서는 대조와 같은 수준에 이르렀으며 긴파장쪽에서는 흡광도가 크게 높아졌다. 이것은 티오뇨소첨가에 의하여 막의 광학적특성이 크게 변화된다는것을 보여준다. 이러한 광학적특성의 변화는 첨가된 티오뇨소에 의하여 결정구조가 달라졌기때문일수도 있고 결정성장특성이 변화되였기때문일수도 있다.

티오뇨소첨가가 페로브스카이트의 광학적특성에 미치는 영향을 더 자세히 보기 위하여 XRD스펙트르분석을 진행하였다.(그림 3) 시료는 UV흡수스펙트르분석에서와 같은 방법으로 준비하였다.

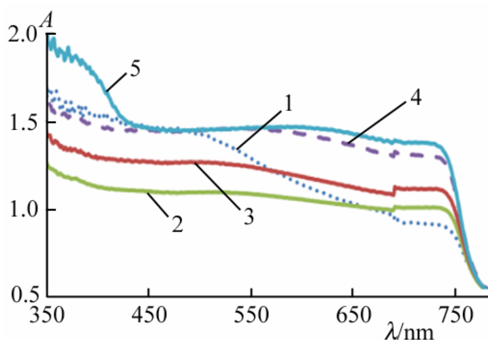


그림 2. 티오뇨소첨가량에 따르는 UV흡수스펙트르변화

1－5는 티오뇨소첨가량이 각각 0, 5, 10, 15, 20mg인 경우

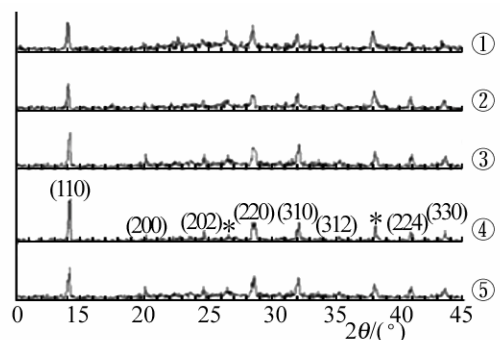


그림 3. 티오뇨소첨가량에 따르는 XRD스펙트르변화특성

①－⑤는 티오뇨소첨가량이 각각 0, 5, 10, 15, 20mg인 경우

모든 시료들에서 페로브스카이트의 특성봉우리들인 14.12, 20.04, 24.52, 28.48, 31.88, 40.64, 43.24°봉우리들이 나타났는데 이것은 정방정계의 페로브스카이트결정상이 명백히 형성되였다는것을 보여준다. 그러나 티오뇨소첨가량에 따라 봉우리높이는 크게 변화되였다. 티오뇨소를 5mg 첨가하였을 때에는 14.12°봉우리가 크게 낮아졌다. 그리고 티오뇨소첨가량이 증가함에 따라 다시 14.12°봉우리가 높아졌으며 잡봉우리들도 작아졌다. 이것은 전구체용액에 첨가된 티오뇨소가 페로브스카이트결정의 성분으로는 들어가지 않으며 단지 결정형성과정에 영향을 미친다는것을 보여준다. 한편 결정형성에 대하여 티오뇨소는 두가지 작용을 한다는것을 말해준다. 즉 티오뇨소가 적은 량으로 첨가되였을 때에는 페로브스카이트의 결정형성을 지연시키고 일정한 첨가량이상에서는 페로브스카이트결정형성을 촉진시킨다는것을 보여준다. 이러한 XRD스펙트르분석자료는 앞의 흡수스펙트르자료와도 일치된다. 즉 티오뇨소첨가량이 10mg이하에서 대조보다 흡광도가 떨어지는것은 첨가된 티오뇨소에 의하여 페로브스카이트결정형성이 지연되는것과 관련되며 10mg이상의 첨가량에서 흡광도가 다시 높아지는것은 결정형성이 촉진되는것과 관련된다.

XRD스펙트르에서 나타나는 페로브스카이트결정형성의 특징은 주사전자현미경상에서도 찾아볼수 있다.(그림 4)

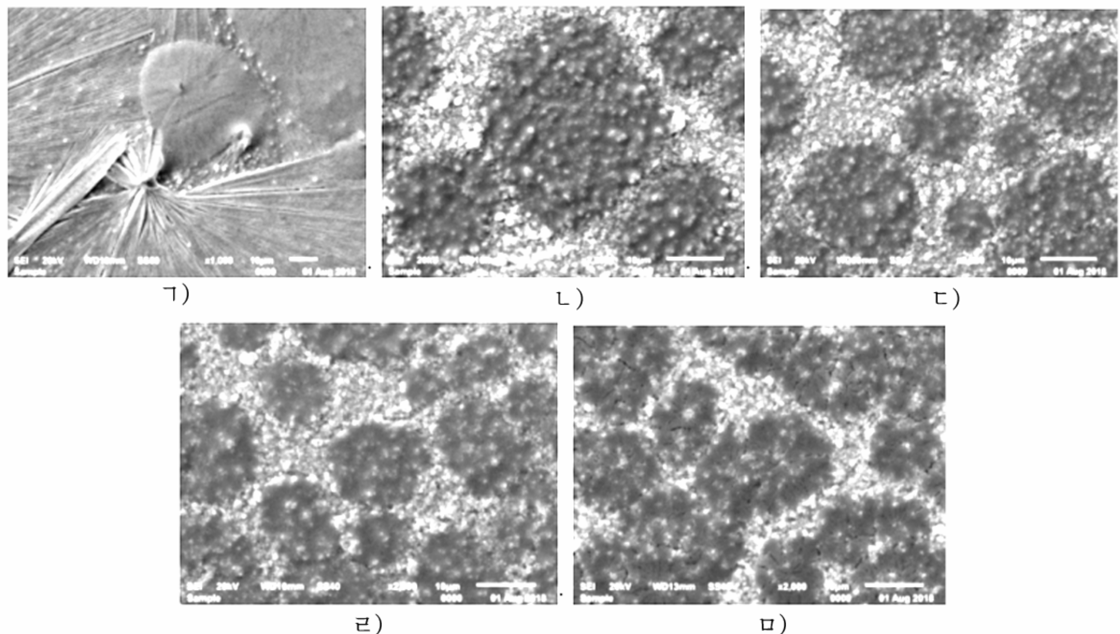


그림 4. FTO/c-TiO_2/TiO_2/ZrO_2막우에 입힌 색소의 전자현미경사진
ㄱ)－ㅁ)는 티오뇨소첨가량이 각각 0, 5, 10, 15, 20mg인 경우

그림 4에서 보는바와 같이 티오뇨소가 없을 때에는 메조다공성층우에 칼도포한 색소의 일부분은 메조다공성층에 침투되여 작은 결정을 형성하고 침투되고 남은 색소들은 ZrO_2층우에서 부채살모양과 둥근 모양의 선명한 결정을 형성하였다. 한편 티오뇨소가 5mg 첨가된 경우에는 메조다공성층에 침투되고 남은 전구체용액이 ZrO_2층우에서 결정을 형성하지 못한채로 남아있었다. 이러한 특성은 10mg 첨가경우까지 계속되다가 15mg 첨가때부터는 그것들이 점점 명백한 결정을 형성하기 시작하였으며 20mg 첨가때에는 선명한 꽃모양의

결정이 ZrO_2층우에 형성되였다.(그림 5) 티오뇨소첨가량이 증가될 때 생기는 결정상은 티오뇨소가 없을 때와 현저히 차이났다. 즉 티오뇨소가 없을 때에는 큰 부채살모양의 결정들이 형성되였지만 티오뇨소를 첨가하였을 때는 일정한 구역에 있는 작은 결정들이 서로 끌어당기면서 하나의 응축된 모양을 나타냈다. 반점들의 크기는 작아지고 뚜렷해지면서 둥근모양으로부터 꽃모양으로 넘어갔다.

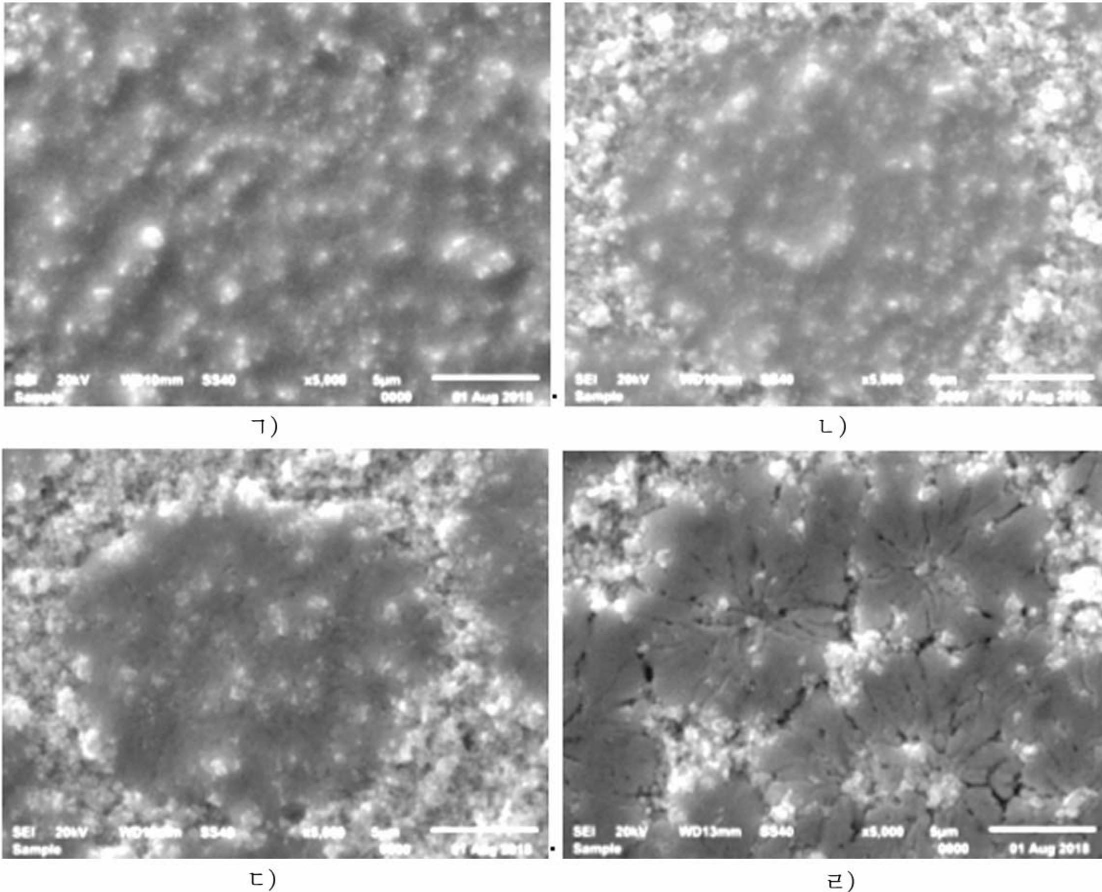


그림 5. FTO/c-TiO_2/TiO_2/ZrO_2막우에 입힌 색소의 전자현미경사진(5 000배)
ㄱ)－ㄹ)는 티오뇨소첨가량이 각각 5, 10, 15, 20mg인 경우

티오뇨소첨가량이 증가할수록 이러한 응축상이 강화되면서 보다 선명한 결정이 생기지만 반면에 15mg이상부터는 빈 구멍이 나타나기 시작하며 20mg에서는 현저하게 나타났다. 이것은 티오뇨소첨가량이 지나치게 많아지면 메조다공성부분을 채우는데 부정적인 영향을 미칠수 있다는것을 보여준다. 결과 20mg이상 첨가하면 태양빛전지에서 충만인자카 크게 떨어지게 된다.

한편 첨가된 티오뇨소가 페로브스카이트결정안에 존재하는가를 확인하기 위하여 EDS분석을 진행하였는데 티오뇨소를 첨가한 색소의 겉면에서 S원자가 존재하였다. 이것은 페로브스카이트전구체용액에 첨가한 티오뇨소가 페로브스카이트결정속에 함께 존재한다는것을 말해준다.

티오뇨소를 리용하여 혼합형페로브스카이트형태양빛전지를 제작한 다른 연구자들의

경우에는 티오뇨소가 페로브스카이트결정에 존재하지 않았다. 그들의 실험에서는 페로브스카이트를 150℃에서 30min동안 처리하여 성장시켰다. 이러한 열처리과정에 티오뇨소가 결정에서 빠져나간다고 설명하였다. 그러나 우리의 실험에서는 100℃에서 20min동안 열처리하였으므로 티오뇨소가 페로브스카이트결정속에 그대로 존재할수 있으며 그것은 EDS분석을 통하여 확인되였다. 그러므로 페로브스카이트결정속에 남아있는 티오뇨소는 페로브스카이트결정형성에 일정한 영향을 미치게 될것이다.

티오뇨소는 페로브스카이트결정형성에서 구아니디움[1]과 같이 결합제로서의 역할을 할수 있다. 티오뇨소는 구조상 2개의 아미노기와 1개의 S주개로 되여있다. 여기서 2개의 아미노기는 구아니디움에서와 같이 페로브스카이트결정의 요드와 수소결합을 형성할수 있으며 S주개는 페로브스카이트의 NH_2기와 수소결합을 형성할수 있다. 즉 3개의 린접한 결정들과 수소결합을 형성하면서 이것들을 서로 결합시킬수 있다. 티오뇨소량이 많으면 많을수록 이러한 결합이 많아져 결정들은 서로 강하게 결합되면서 하나의 응축된 상을 이루게 된다.

티오뇨소를 첨가하였을 때 일어나는 이러한 변화는 티오뇨소가 다음의 두가지 작용을 통하여 메조다공성층에 치밀한 페로브스카이트결정을 형성시킬수 있다는것을 보여준다. 첫째로, 티오뇨소가 페로브스카이트의 PbI_2과 산염기부가물을 형성하면서 페로브스카이트결정형성을 지연시켜 균일한 결정들을 형성시킨다. 둘째로, 티오뇨소는 구아니디움과 마찬가지로 다공성C층과 ZrO_2층안에서 형성된 결정들을 서로 결합시켜 다공성층안에서 빈구멍을 제거함으로써 구멍이 없는 페로브스카이트결정을 형성한다.

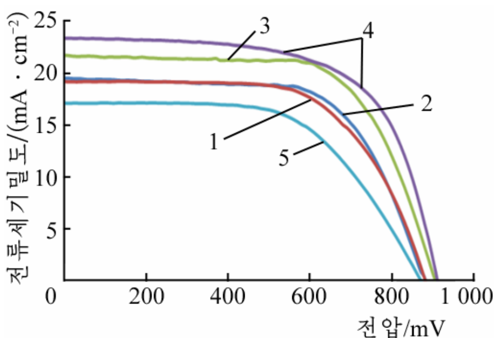


그림 6. 티오뇨소첨가량에 따르는 빛전류세기—전압곡선
1—5는 티오뇨소첨가량이 각각 0, 5, 10, 15, 20mg인 경우

티오뇨소첨가색소를 리용한 태양빛전지의 빛전기변환특성을 검토하기 위하여 I-V곡선을 작성하였다.(그림 6)

그림 6에서 보는바와 같이 대조색소에서는 열린회로전압 0.881V, 닫긴회로전류세기 19.47mA, 충만인자 0.65, 효률 11.15%였지만 15mg의 티오뇨소를 첨가한 색소에서는 열린회로전압 0.910V, 닫긴회로전류세기 23.32mA, 충만인자 0.64, 효률 13.58%로서 빛전기변환특성이 크게 개선되였다.

티오뇨소첨가량에 따르는 태양빛전지의 빛전기변환특성값들은 표 1과 같다.

표 1. 티오뇨소첨가량에 따르는 태양빛전지의 빛전기변환특성값들

티오뇨소 첨가량/mg	열린회로 전압/mV	닫긴회로전류세기밀도 /(mA · cm^{-2})	충만인자	효률/%
0	881	19.47	0.65	11.15
5	881	19.16	0.63	10.63
10	905	21.68	0.66	12.94
15	910	23.32	0.64	13.58
20	870	17.08	0.59	8.77

표 1에서 보는바와 같이 티오뇨소를 15mg 첨가하였을 때에는 10mg 첨가하였을 때보다 충만인자가 약간 떨어지는데 그것은 SEM분석자료에서 본바와 같이 페로브스카이트층에서 빈 구멍들이 생기기 시작하는것과 관련될수 있다. 티오뇨소를 첨가하였을 때 일어나는 효률증가는 XRD, SEM분석자료에서 본바와 같이 보다 치밀한 결정이 메조다공성층을 구멍없이 채운것과 관련된다. 그러나 티오뇨소첨가량이 지나치게 많아지면 페로브스카이트층에서 빈 구멍들이 생겨나기 시작하면서 재결합이 강화되고 충만인자가 떨어져 태양빛전지효률을 떨군다.

다음으로 빛려기전하전달자의 동적특성을 조사하기 위하여 빛발광분석을 진행하였다.(그림 7) 빛발광분석을 통하여 빛쪼임조건에서 생기는 전하전달자들의 동적상태를 알수 있다. 빛발광분석을 위한 시료는 유리와 FTO, FTO/c-TiO_2우에 페로브스카이트를 칼도포법으로 입혀 준비하였다.

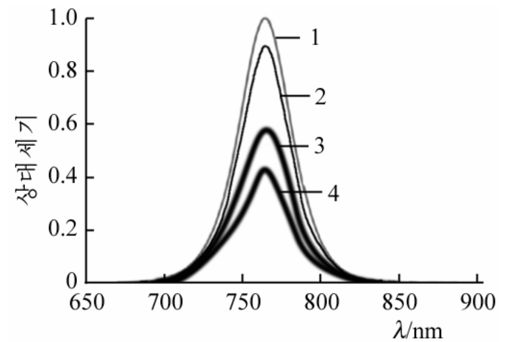


그림 7. 정상상태에서의 PL스펙트르
1－유리에 입힌 5mg티오뇨소첨가색소, 2－유리에 입힌 대조색소, 3－FTO/c-TiO_2에 입힌 대조색소, 4－FTO/c-TiO_2에 입힌 15mg티오뇨소첨가색소

500nm의 빛을 쪼여주었을 때 PL봉우리는 대조색소와 티오뇨소첨가색소에서 다같이 760nm에서 나타났다. 빛발광파장이 티오뇨소첨가에 의하여 달라지지 않는것은 티오뇨소가 페로브스카이트의 에네르기준위를 변화시키지 않는다는것을 말해준다. 즉 첨가된 티오뇨소는 페로브스카이트결정들을 호상 결합시키는 작용을 한다고 볼수 있다.

PL세기는 티오뇨소첨가색소를 유리기판에 입힌 경우 대조색소경우보다 높았다.(그림 10의 1과 2) 이것은 티오뇨소첨가색소에서 비복사재결합이 크게 억제된다는것을 말해준다. 한편 c-TiO_2우에 티오뇨소첨가색소를 입히고 PL세기를 측정하였을 때 대조색소경우보다 PL세기가 낮아졌다. 페로브스카이트결정에서 빛에 의하여 생긴 전하는 c-TiO_2로 넘어가면서 PL세기가 낮아지게 된다. 이로부터 티오뇨소를 첨가한 색소에서 생긴 전하가 효과적으로 TiO_2에로 전달된다는것을 알수 있다. 빛발광분석을 통하여 15mg의 티오뇨소를 첨가한 색소에서 열린회로전압과 닫긴회로전류세기가 높아진것은 티오뇨소에 의하여 보다 치밀하고 발달된 결정이 형성됨으로써 그것의 비복사재결합과 전하수송특성이 개선된것과 관련된다는것을 알수 있다. 한편 티오뇨소첨가색소에서 충만인자가 대조색소에 비하여 약간 떨어진것은 색소의 응축현상으로 하여 페로브스카이트층에 약간의 구멍이 생기는것과 관련된다. 이것은 대조색소경우보다 20mg의 티오뇨소를 첨가한 색소의 경우 효률이 떨어지는것을 통해서도 알수 있다.

티오뇨소첨가가 전하재결합에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 전기화학완전저항분석을 진행하였다. 완전저항을 위한 등가회로와 나이크위스트선도는 그림 8과 같다.

높은주파수대역에서 실수축과의 사귐점은 직렬옴저항(R_s)을 나타내며 여기에는 TiO_2의 저항과 $CH_3NH_3PbI_3$의 저항이 속한다. 높은주파수대역에서의 첫번째 반원은 대극/페로브스카이트계면에서의 전하전달저항을 나타내는 R_1에 대응되며 중간주파수대역에서의 두번째 반원은 TiO_2/페로브스카이트계면에서의 재결합저항(R_2)을 나타낸다.

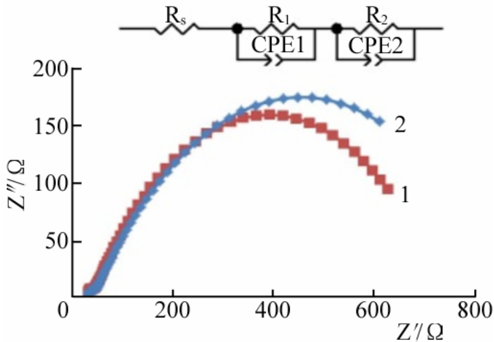


그림 8. 티오뇨소첨가에 의한 나이크위스트선도의 변화

1과 2는 티오뇨소첨가량이 각각 0, 15mg인 경우; 완전저항은 어둠조건에서 편의전압 −0.8V를 걸어주고 측정하였다.

전기화학분석의 나이크위스트선도로부터 얻은 전자재결합특성값들은 표 2와 같다.

티오뇨소를 첨가하였을 때의 재결합저항과 상수상요소값은 각각 829.3Ω·cm^{2}과 2.409×10^{-5}F/cm^{2}로서 티오뇨소가 없을 때의 701.1Ω·cm^2, 1.303×10^{-5}F/cm^{2}보다 크게 높아졌다. 결과 TiO_2/페로브스카이트계면에서 전자수명은 티오뇨소를 첨가하였을 때 19.97ms로서 티오뇨소가 없을 때의 9.13ms보다 거의 2배나 길다. 이것은 티오뇨소를 첨가할 때 루실전류가 절반으로 줄어들수 있다는것을 보여준다.

완전저항분석으로부터 나온 전하수명은 어둠조건에서의 역전류의 전하수명으로서 이 값은 재결합특성을 반영한다. 즉 이 값이 클수록 재결합속도는 그만큼 작아진다. 빛발광실험에서 유리기판에서의 PL세기가 대조보다 티오뇨소첨가색소에서 더 높아진것은 같은 빛에 의하여 더 많은 전하전달자들이 발생하였다는것을 의미한다. 한편 c-TiO_2에서의 PL세기가 대조보다 티오뇨소첨가색소에서 더 낮아진것은 빛에 의하여 생긴 전하전달자가 TiO_2을 통하여 빨리 수송된다는것을 보여준다. 즉 티오뇨소첨가에 의하여 페로브스카이트의 빛수집기능이 강화되고 TiO_2에로의 전하수송속도가 개선된것 그리고 재결합저항이 증가된것으로 하여 전류세기밀도와 열린회로전압이 크게 증가되면서 태양빛전지효률이 증가된다.

표 2. 전기화학분석의 나이크위스트선도로부터 얻은 전자재결합특성값들

티오뇨소 첨가량/mg	재결합저항(R_2) /(Ω·cm^2)	상수상요소값(CPE2) /(F·cm^{-2})	전자수명(τ_n) /ms
0	701.1	1.303×10^{-5}	9.13
15	829.3	2.409×10^{-5}	19.97

맺 는 말

3층메조다공성골격을 통해 침투시키는 티오뇨소가 페로브스카이트결정형성에 미치는 영향을 검토하였다. 티오뇨소는 페로브스카이트의 Pb에 배위되면서 페로브스카이트결정형성을 지연시키고 또 페로브스카이트안의 I, NH_2기와 수소결합을 형성하면서 치밀하고 균일한 결정을 메조다공성골격안에 형성시켰다. 결과 페로브스카이트의 빛수집기능과 전하전달자수송기능이 강화되고 재결합저항이 커지면서 태양빛전지의 효률이 크게 개선되였다.

참 고 문 헌

[1] X. M. Hou et al.; J. Mater. Chem., A 5, 73, 2017.
[2] X. Li et al.; Nat. Chem., 7, 703, 2015.
[3] Akihiro Kojima et al.; J. Am. Chem. Soc., 131, 6050, 2009.
[4] Best Research-Cell Efficiencies. http://www.nrel.gov/pv/assets/images/efficiency_chart.jpg(2016-08-12).
[5] Wei-Ting Wang et al.; ACS Appl. Mater. Interfaces, 9, 1074, 2017.
[6] Liang Li et al.; Adv. Mater., 28, 9862, 2016.
[7] Michael Grätzel; Acc. Chem. Res., 50, 487, 2017.
[8] Guangsheng Fu et al.; Solar Energy Materials & Solar Cells, 165, 36, 2017.
[9] Yongzhen Wu et al.; Adv. Mater., 29, 1073, 2017.
[10] Feijiu Wang et al.; J. Phys. Chem., C 121, 1562, 2017.
[11] Chuanjiang Qin et al.; Adv. Mater., 29, 3808, 2017.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Effect of Thiourea on Perovskite Crystallization for Fully Printable Solar Cells

Cha Kyong Jin, Ko Song Guk, Ryu Kwon Il, Kim Pyol and *Ri Jin Hyok*

Thiourea retards the growth of the perovskite crystals by forming lewis acid base adducts and then makes the neighboring perovskite crystals combined each other by forming hydrogen bonds with iodine atoms and NH_2 groups in the perovskite films, from which compact and well contacted crystals are made in the mesoporous scaffolds. Therefore, the performances of perovskite solar cell with thiourea are improved significantly by 30% (from 10.63% of device without thiourea to 13.58% of device with thiourea).

Key words: thiourea, perovskite solar cell, cross linker

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

농작물생육모의에 의한 토지의 무비료 소출능력평가방법

류철성, 김광연, 한순옥

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과학과 기술의 시대, 정보화시대의 요구에 맞게 농촌기술혁명을 힘있게 벌려 농촌경리의 물질기술적토대를 더욱 강화하고 농업의 과학화, 현대화수준을 끊임없이 높여나가야 합니다.》

토지의 생산성을 주성분분석, 다변량회귀분석 등 통계적방법으로 평가하는 경우 농작물생육기간 기상기후, 영양원소보장조건 등의 변화동태를 반영할수 없는것과 관련하여 생산성차이를 구체적으로 나타낼수 없다.[1, 3] 이러한 변화동태를 반영할수 있는 효과적인 방법의 하나는 농작물생육과정을 일별로 모의하여 입력변수들이 농작물생육에 미치는 작용과 그 결과가 농작물소출에 반영되도록 하는것이다.

우리는 토지의 무비료소출능력을 농작물생육모의방법으로 평가하기 위한 연구를 하였다.

자료와 방법

자료 토지의 무비료소출능력계산에서는 농작물의 생육에 큰 영향을 주며 소출과의 상관이 큰 지표들을 리용하였다. 여기에는 일평균기온, 최고기온, 최저기온, 강수량, 해비침률, 바람속도, 상대습도, 포차와 같은 기상기후학적지표들과 지점별위도, 해발높이, 경사도, 방위, 해안으로부터의 거리와 같은 지형학적지표들, 포전별 토양류형, 토심, 알갱이조성, 돌자갈함량, 산도, 부식함량, 수리조건, 기계화조건, 특수피해, 건습랭습관계 등의 토양학적지표들이 속한다.

기상기후자료로는 2013－2018년까지 6년동안의 기상관측자료를 리용하였고 지형자료와 토양자료는 제11차 포전별토양조사분석자료를 리용하였다.

방법 먼저 농작물생육모의모형을 리용하여 무비료조건에서의 기후학적생산잠재력을 평가하고 그것을 지력점수와 결합시키는 방법으로 토지의 무비료소출능력을 평가하였다.

결과 및 론의

1) 기후학적생산잠재력평가

기후학적생산잠재력은 표준토양조건에서의 무비료소출능력을 농작물생육모의에 의하여 얻는 방법으로 평가하였다.

표준토양조건은 논의 경우 알갱이조성이 질메흙이고 토심이 깊으며 랭습, 특수피해가 없고 토양산도가 약산성이며 부식함량이 많은 갈색논토양으로 하였고 밭의 경우 알갱이조성이 메흙이고 토심이 깊으며 습해와 특수피해가 없고 토양산도가 약산성이며 부식함량이 많은 갈색밭토양으로 하였다.

기후학적생산잠재력을 평가하는 농작물생육모의모형의 체계관계도는 그림과 같다.

그림. 기후학적지력평가모형의 체계관계도

기후학적생산잠재력평가모형은 해당 지역의 빛, 온도, 물보장조건, 영양원소보장성을 통일적으로 고려하는 종합모형으로서 수백여개의 요소적모형들의 결합으로 이루어져있다.

농작물생육모의에서는 빛조건, 온도조건, 강수조건, 영양원소보장조건 등을 입력변수로 하여 농작물의 빛합성과정, 숨쉬기과정, 발육과정, 토양안에서의 물과 영양원소이동과정 등을 일별로 모의하여 기후학적인 소출잠재력을 계산한다.

같은 군안에서도 지점별로 기상조건에서 차이가 있다.(표 1)

표 1. 함경남도 리원군의 지점별기온차이(℃)

지점	4월		5월		6월		7월		8월		9월	
	최고	최저	최고	최저	최고	최저	최고	최저	최고	최저	최고	최저
1	12.2	2.8	18.2	8.4	20	13.2	23.7	17.7	25.8	19.4	22.8	13.9
2	13	2.6	19.4	8.3	21.2	13.1	24.7	17.5	26.6	19.2	23.2	13.8
3	14.1	2.6	20.1	8.2	21.5	12.8	24.8	17.1	26.6	19	23.2	13.5

기후학적생산잠재력평가모형에서는 해발고와 해안거리에 따르는 기온변화를 생태지역과 순별로 작성한 다음의 회귀식을 통하여 반영하였다.

$$\triangle t = A_1(h_0 - h) + A_2(S_0 - S)$$

여기서 $\triangle t$는 포전면우에서의 평균기온과 기상관측소에서 관측한 값과의 차(℃), h_0은 관측지점의 해발고(m), S_0은 관측지점까지의 해안거리(km), h는 포전의 해발고(m), S는 포전위치까지의 해안거리(m)이다. A_1과 A_2는 생태지역과 순별로 추정한 회귀결수이다.

다음 경사도와 방위에 따르는 하루총복사량의 변화는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$Q/Q_0 = \cos\alpha + 0.5\sin\alpha(\cos\beta + |\sin\beta|)\tan\psi - \frac{0.08\tau_0\sin\alpha(\cos\beta + |\sin\beta|)\sin\delta}{\cos\psi(\tau_0\sin\psi\sin\delta) + \cos\psi\cos\delta\sin\tau_0}$$

여기서 Q_0은 평지조건에서의 하루총복사량, Q는 경사각이 α이고 경사방위각이 β인 경사지에서의 하루총복사량, δ는 태양적위, ψ는 위도, α는 토양결면의 평균경사각, β는 경사방위

각, τ_0는 해뜨고 지는 시각을 나타내는 시간각이다.

평지에서와 경사지에서의 태양직달복사세기의 비(I/I_0)는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$I/I_0=(\sin\alpha\cdot\cos h_0\cdot\cos(\beta-A)+\cos\alpha\cdot\sin h_0)/\sin h_0$$

여기서 I_0은 평지조건에서의 태양직달복사세기, I는 경사지조건에서의 태양직달복사세기, α는 경사각, β는 경사방위각, h_0은 태양고도각, A는 태양방위각이다.

평지에 비한 경사지에서 평균기온의 변화($\triangle t$)는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\Delta t=(17.6\sqrt{D}-9.68)\left[0.17+1.03(I/I_0-1)\sin h_1\cdot I_\alpha\cdot I_{h_0}\right]$$

여기서 D는 해비침률, h_1은 39°의 위도에서 13시 30분 때 태양고도각이다. 또한 $I_\alpha=\begin{cases}0, & \alpha=0\\1, & \alpha\neq 0\end{cases}$, $I_{h_0}=\begin{cases}0, & h_0\geq 62.1\\1, & h_0<62.1\end{cases}$ 이다.(α와 h_0은 각각 경사도와 태양고도각)

2) 논밭토양의 지력점수평가

토양학적지표들을 무비료소출에 주되고 보편적인 영향을 주는 기본요인들과 부차적이고 특수한 영향을 주는 보조요인들로 가르고 기본요인들의 종합점수와 보조요인들의 소출결수를 결정한 다음 다음식으로 지력점수를 평가하였다.

$$K_{지력}=K_{기본}\times K_{보조}$$

여기서 $K_{지력}$은 토양의 지력점수, $K_{기본}$은 기본요인들의 종합점수, $K_{보조}$는 보조요인들의 소출결수이다.

기본요인들로는 토양류형, 알갱이조성, 토심, 토양산도, 부식함량을 설정하였고 보조요인들로는 논에서는 랭습관계, 특수피해, 돌자갈함량, 수리조건, 기계화조건을, 밭에서는 경사도, 음양관계, 건습관계, 특수피해, 돌자갈함량을 설정하였다.

$K_{기본}$은 다음식에 의하여 결정하였다.

$$K_{기본}=\sum_i a_i\times K_i$$

여기서 $K_{기본}$은 기본요인들의 종합점수, K_i는 i번째 요인의 요인점수, a_i는 i번째 요인의 무게결수이다.

$K_{기본}$은 모든 기본요인들이 농작물생육에 제한요인으로 작용하지 않을 때 1이고 그렇지 않을 때 1보다 작은 정수값을 가진다.

요인점수는 토양류형이나 알갱이조성과 같은 질적지표인 경우 선행한 시험자료를 통한 소출비률로, 토심이나 토양산도, 부식함량과 같은 량적지표인 경우에는 선행방법[2]에 준하여 회귀식을 리용하여 정하였다.(표 2－6)

표 2. 논토양류형에 따르는 요인점수

토양류형	갈색논, 하성충적지논, 해하성충적지논	골짜기충적지논	염해간석지논, 진펄논	골짜기논	해안모래논, 비정상논
점수	1	0.9	0.8	0.7	0.5

표 3. 밭토양류형에 따르는 요인점수

토양류형	갈색(적갈색, 고풍화층)밭, 하성(해하성)충적지밭	골짜기충적지밭, 현무암류갈색밭, 진펄밭	간석지밭	해안모래밭, 표백화갈색밭, 비정상밭	부석층밭
점수	1	0.8	0.6	0.4	0.3

표 4. 논토양류형별 알갱이조성에 따르는 요인점수

토양류형	질흙	질메흙	메흙	모래메흙	모래흙
해하성충적지논, 하성충적지논, 진펄논	1	1	0.85	0.7	0.55
갈색논, 고풍화층논, 적갈색논, 골짜기충적지논, 해안모래논, 비정상논	0.9	1	0.85	0.7	0.55

표 5. 밭토양의 알갱이조성에 따르는 요인점수

알갱이조성	질흙	질메흙	메흙	모래메흙	모래흙
점수	0.8	0.9	1	0.8	0.5

표 6. 논밭토양에서 토심, 토양산도, 알갱이조성에 따르는 요인점수평가모형

논토양		밭토양	
지표	요인점수평가모형	지표	요인점수평가모형
토심 /cm	$K_{토심} = -0.000\ 2x^2 + 0.027\ 8x + 0.11$ ($x \geqq 50$ 이면 $x = 50$)	토심 /cm	$K_{토심} = -0.000\ 5x^2 + 0.051x - 0.3$ ($x \geqq 50$ 이면 $x = 50$)
토양 산도	$K_{산도} = -0.051\ 1x^2 + 0.613x - 0.838\ 4$	토양 산도	$K_{산도} = -0.078\ 1x^2 + 0.982\ 7x - 2.075$
부식 함량/%	$K_{부식} = -0.142\ 9x^2 + 0.712\ 9x + 0.145\ 3$	부식 함량/%	$K_{부식} = -0.271\ 4x^2 + 1.140\ 7x - 0.195\ 5$

토양류형, 알갱이조성, 토심, 산도, 부식함량과 같은 기본요인들이 소출에 기여하는 상대적인 몫이 각이한것으로 하여 선행한 소출시험자료들로부터 무게결수를 다음과 같이 정하였다.

표 7. 논과 밭에서 기본요인들의 무게결수

지목	토양류형	알갱이조성	토심	산도	부식함량
논	0.20	0.30	0.25	0.10	0.15
밭	0.15	0.25	0.3	0.15	0.15

보조요인들의 소출결수는 다음식에 의하여 결정하였다.

$$K_{보조} = \prod_{i=1}^{5} K_i$$

여기서 K_i는 i번째 보조요인의 소출지수이다.

보조요인으로는 논의 경우에 랭습관계, 특수피해, 돌자갈함량, 수리조건, 기계화조건을 설정하였고 밭의 경우에 경사도, 음양관계, 건습관계, 특수피해, 돌자갈함량을 설정하였다.

소출지수는 보조요인에 의하여 낮아지는 소출비률로서 선행한 소출시험자료들로부터 선행방법[2]에 준하여 다음과 같이 정하였다.

논에서 보조요인의 수준별 소출지수평가모형

랭습관계에 따르는 지수: $K_{랭습} = 1 - (1 - R_{랭습}) \times \dfrac{S_{랭습}}{S_{포전}}$

여기서 $S_{랭습}$은 랭습받는 면적, $S_{포전}$은 포전면적, $R_{랭습}$은 랭습피해를 받는 면적에서 낮아지는 소출비률(0.8)이다.

특수피해에 따르는 지수: $K_{특수}=1-\frac{R_{특수}}{8\,000}$

여기서 $R_{특수}$는 특수피해로 낮아지는 소출량이다.

돌자갈함량에 따르는 지수: $K_{돌}=1-0.000\ 3x^2-0.005\ 8x$

여기서 x는 돌자갈함량(%)이다.

수리조건에 따르는 지수($K_{수리}$): 안전답 1, 물부족 0.8, 천수답 0.6

기계화조건에 따르는 지수: $K_{기계}=1-0.000\ 4x^2-0.004\ 3x$

여기서 x는 경사도이다.

밭에서 보조요인들의 수준별 소출지수평가모형

상습지, 계절습지관계에 따르는 지수: $K_{습}=1-(1-R_{습})\frac{S_{습}}{S_{포전}}$

여기서 $S_{습}$－습해받는 면적, $S_{포전}$－포전면적, $R_{랭습}$－습해받는 면적에서 낮아지는 소출비률(계절습지인 경우 0.8, 상습지인 경우 0.6)이다.

특수피해에 따르는 지수: $K_{특수}=1-\frac{R_{특수}}{8\,000}$

여기서 $R_{특수}$는 특수피해로 낮아지는 소출량(kg/정보)이다.

돌자갈함량에 따르는 지수: $K_{돌}=1-0.000\ 35x^2-0.006\ 18x$

여기서 x는 돌자갈함량(%)이다.

음양관계에 따르는 지수($K_{음양}$): 양지 1, 음양지 0.9, 음지 0.8

경사도에 따르는 지수: $K_{기계}=1-0.001\ 2x^2-0.000\ 07x$

여기서 x는 경사도이다.

3) 무비료소출능력평가와 적합성검정

토지의 무비료소출능력은 다음식에 의하여 평가하였다.

$$Y_{무비}=Y_{기후}\cdot K_{지력}$$

여기서 $Y_{무비}$는 토지의 무비료소출능력이고 $Y_{기후}$는 농작물생육모의에 의한 기후학적생산잠재력이며 $K_{지력}$은 토양의 지력점수이다.

무비료소출능력평가결과의 적합성검정은 2013－2018년까지 6년간의 도별 논벼, 강냉이 실소출자료와 무비료소출능력과의 상관결수를 계산하는 방법으로 진행하였다.(표 8)

표 8. 실소출과 무비료소출능력과의 상관분석결과

도별	논	밭	도별	논	밭
평양시	0.932	0.482	강원도	0.701	0.913
평안남도	0.962	0.799	함경남도	0.727	0.595
평안북도	0.960	0.949	함경북도	0.835	0.819
자강도	0.781	0.859	량강도	0.909	0.880
황해남도	0.984	0.890	남포시	0.895	0.526
황해북도	0.975	0.594	평균	0.878	0.683

표 8에서 보는바와 같이 실소출과 무비료소출능력과의 상관결수는 논에서 평균 0.88, 밭에서 평균 0.68로서 높았다.

이로부터 우리는 농작물생육모의에 의한 토지의 무비료소출능력평가방법이 토지의 생산성을 비교적 정확히 나타낼수 있다고 본다.

맺 는 말

토지의 무비료소출능력을 농작물생육모의에 의하여 평가하는 경우 실소출과 무비료소출능력사이의 상관성을 높일수 있다.

참 고 문 헌

[1] **김일성**종합대학학보 생명과학, 64, 2, 132, 주체107(2018).

[2] 정봉남; 다변량해석총서 1, 과학백과사전종합출판사, 11～30, 1988.

[3] Jinjin Cheng et al.; Soil & Tillage Research, 155, 225, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Method to Evaluate the Fertilizer-Free Yield Capacity of the Land by Simulation of the Crop Growth

Ryu Chol Song, Kim Kwang Yon and *Han Sun Ok*

The correlation between the real yield and the fertilizer-free yield capacity can be enhanced when the fertilizer-free yield capacity of the land is evaluated by simulation of the crop growth.

Key words: simulation, yield capacity

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

조개류(Bivalvia)에서 혈액세포의 형태학적특징과 기능

김룡길, 류호진

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《양어와 양식을 새로운 과학적토대우에 올려세우고 그 생산성을 높여 인민들에게 더 많은 물고기와 양식물이 차례지게 하여야 합니다.》

세면이 바다로 둘러싸여있는 우리 나라에서 양어양식물의 생산을 늘이기 위해서는 양어양식을 과학화하고 수산자원을 적극 보호증식시켜야 한다.

조개류의 혈액에 대한 연구를 심화시키는것은 조개류에서 혈액의 기능을 파악하고 환경변화와 오염을 비롯하여 여러가지 요인에 의한 조개의 죽는 원인을 해명하며 조개자원의 보호증식대책을 세우는데서 중요한 문제로 제기된다.

지금까지 물고기류의 혈액세포들에 대한 연구자료[1－3]는 일부 발표되였으나 조개류의 혈액세포들에 대한 연구는 매우 적게 진행되였다.

론문에서는 조개류의 혈액세포들의 형태학적특징과 그 기능에 대한 연구정형을 종합하였다.

1. 조개류(Bivalvia)에서 혈액세포들의 형태학적특징

물고기류와 포유류에서는 혈액세포들이 류형별로 뚜렷하게 갈라지고 세분화되여 분류되고있다.[4, 5] 그러나 조개류에서는 혈액세포의 형태와 구분방법에 대한 론의가 현재까지도 계속 진행되고있다.[13, 28, 49]

모든 연체동물들의 혈액세포들은 기본적으로 2개의 류형 즉 과립세포와 무과립세포(혹은 투명세포)로 뚜렷하게 갈라진다는 연구결과들이 쌀합박조개류의 한종(*Mercenaria mercenaria*)[16, 44], 보라섭조개(*Mytilus eduls*)[38, 39], 섭조개류의 한종(*M. galloprovincialis*)[11, 12], 도끼조개(*Mya arenaria*)[25, 44], 굴류의 한종(*Crassostrea virginica*)[21], 바스레기의 한종(*Ruditapes decussates*)[29] 그리고 변두조개(*Cristaria plicata*)[49] 등에서 얻어졌다.

연구자에 따라 이 과립세포들과 무과립세포들을 몇개의 류형으로 세분하여 갈라보기도 한다.[17, 47, 50] 실례로 조개류의 한종(*Cerastoderma edule*)[42], 굴류의 한종(*Crassostrea virgica*)[23], 개굴조개류의 한종(*Anodonta cygnea*)[28] 등에서 혈액세포들이 세가지 류형으로 구분되였다.

이밖에 조개류의 혈액세포들을 과립세포와 무과립세포, 혈소판세포, 배체세포, 소포세포들로 구분한 연구자료[6, 16, 21]도 있다.

바다조개류의 혈액세포들에 대한 연구[17, 20, 41]에 비하여 민물조개류의 혈액세포에 대한 연구[49]는 적게 진행되였다.

조개류에서 혈액세포들의 류형은 적용되는 기술에 따라서도 여러가지로 구분된다.[14, 29]

혈액세포들을 형태학적으로 구분하여 식별할만 한 자료가 충분하지 못하기때문에 혈액

세포들을 류형별로 구분하는데서 주로는 조개혈액세포들의 생화학적, 생리학적기능을 기준으로 한다.[10, 17, 47] 그러나 조개류에서 혈액세포들을 형태학적으로 자세하게 평가하는 것은 그것들의 생화학적, 생리적기능 등을 형태학적특징과 결부시키는 측면에서 매우 유익할것으로 보고있다.[13, 24, 28, 49]

대다수 조개류의 혈액세포들에서 과립세포들은 세분화되여 구분되고있다.

과립세포들은 세포질과립에 의하여 다른 혈액세포들과 뚜렷하게 구별되는데[24] 세포질과립은 호산성과립과 호염기성과립[47] 그리고 호중성과립으로 구분할수 있다.[17] 미성숙과립세포들은 호염기성과립들을 포함하고있고 성숙과립세포들은 호산성과립들을 포함하고있다.[15] 실례로 변두조개 *C. plicata*의 혈액세포에서 성숙과립세포들은 호산성과립들을 포함한다. 작은과립세포들은 미성숙혈액세포들과 마찬가지로 호염기성과립들을 가지고있고 성숙된 작은과립세포들이나 큰과립세포들은 호산성과립들을 가지고있다.[49]

투과주사식전자현미경으로 과립세포들을 관찰할 때 많은 밀집된 세포질과립들을 볼수 있지만 무과립세포들에는 그러한것들이 없거나 매우 적게 들어있다.[15, 24] 밥조개류의 한종(*Argopecten irradians*)에는 전자현미경상에서 나타나는 세가지 류형의 과립이 있는데 첫번째 류형에서 과립밀도가 높고 두번째 류형에서는 낮으며 세번째 류형에서는 그 중간정도이다.[50] 쌀함박조개류의 한종(*M. mercenaria*)에서 과립세포들은 몇개의 긴 다형성의 밀집소포를 가지고있다.[16] 변두조개(*C. plicata*)에도 여러가지 현미경적크기와 모양을 가진 과립들이 포함되여있다.[49]

조개류의 한종(*Scrobicubiculataria plana*)[47], 굴류의 한종(*Crassostrea virginica*)[33], 섭조개류의 한종(*Mytilus galloprovincialis*)[12], 보라섭조개(*M. edulis*)[35, 37], 바스레기(*Venerupis philippinarum*)[17], 바스레기과의 한종(*Ruditapes decussates*)[29], 대합(*Meretrix lusoria*)과 참굴(*Crassostrea gigas*)[13] 등 많은 조개류의 혈액세포들에서 과립세포들은 두가지 부류 즉 호염기성과립세포와 호산성과립세포로 갈라진다. 그런데 작은차거조개 *Tridacna crocea*, 민물섭조개류의 한종인 *Perna perna*를 비롯한 일부 조개들의 혈액세포에서는 호염기성과립세포들이 관찰되지 않는다.[9, 35]

밥조개류의 한종인 *A. irradians*의 혈액세포[46]와 변두조개 *C. plicata*의 혈액세포[49]에서 과립세포들을 크기정도에 따라 두가지 부류 즉 작은과립세포와 큰과립세포로 세분하여 갈라볼수 있다.

조개류의 혈액세포들중 무과립세포들에는 일반적으로 세포질과립들이 없거나 매우 적으며 핵이 비교적 크고 적은 체적의 세포질로 둘러싸여있다.[24, 35] 또한 이 세포들은 광학 및 전자현미경상에서 서로 다른 형태로 나타난다.[7] 그러므로 무과립세포들은 두가지 부류로 세분하는데 그중 한 부류는 핵이 알모양 혹은 구모양으로서 세포중심에 있으며 세포기관자들이 없는 적은 세포질로 둘러싸여있다. 이것을 배체혈액세포로 보는데[49] 연구자들마다 각이하게 부르고있다. 실례로 작은투명혈액세포[50] 혹은 작은림파세포[32]라고 부른다. 다른 한 부류의 무과립세포는 림파구보다 크고 여러가지 세포기관자들을 함유할수 있게 세포질이 많다. 따라서 이 혈액세포들은 투명혈액세포[32] 또는 큰투명혈액세포라고 부른다.[50] 그러나 일부 연구자들은 무과립세포들에는 한가지 부류 즉 무과립혈액세포 또는 투명혈액세포만이 있다고 보고있다.[11, 16, 48]

조개류에서 혈액세포들은 실험실적조건에서 몇h동안 유지될수 있다.[33] 조개류의 산 혈액세포들은 기질에 부착된 상태로 존재하는데[35] 이러한 특성은 혈액세포의 분류에 적용되고있다.[21]

조개류에서 혈액세포들의 개별적인 류형들이 나타나는 비률은 종에 따라 차이난다. 즉 일부 조개류의 종들에서는 작은과립세포들과 투명혈액세포들이 주로 나타나고 큰과립세포들과 그밖의 다른 혈액세포들이 적게 나타난다.[21, 35, 47－49] 그러나 다른 일부 종들에서는 무과립세포들이 대부분이다.[9, 50] 굴류의 한종인 *Crassostrea rhizophorae*의 혈액세포들에서는 한가지 류형의 세포가 실제적으로 여러가지로 많이 갈라지는데 그것은 환경에 적응하여 과립이 축적되거나 적어지는것으로(크기는 작아지지 않는다.) 나타난다.[31]

이처럼 조개류의 혈액세포들에서 혈액세포류형들은 연구자들마다 그리고 조개가 사는 환경조건에 따라 다르게 구분되므로 많은 조개종들에서 혈액세포들에 대한 연구를 더욱 심화시켜야 한다.

2. 조개류(Bivalvia)에서 혈액세포들의 기능

조개류에서 세포면역은 혈액세포들인 과립세포와 무과립세포들의 기능과 관련되여있는데 영양, 로페물처리, 방어 등의 기능을 수행한다.[26] 연체동물의 혈액세포들은 세균[37], 기생성원생동물[8]과 같은 이종생물체들을 능동적으로 탐식하는것을 비롯한 면역기능을 수행한다. 이외에도 젖가루[35]나 탄소화합물[40] 등 이종물질들을 탐식한다.

함박조개류의 한종(*M. gulloprovincialis*)과 참굴(*C. gigas*)에서 과립세포들은 무과립세포들보다 탐식능력이 더 세다.[11, 43] 그러나 보라섭조개(*M. edulis*)와 작은차거조개(*T. crocea*)에서는 무과립세포들 혹은 투명혈액세포들이 뚜렷한 탐식능력을 나타낸다.[32, 35] 변두조개(*C. plicata*)[49]와 바스레기(*Tapes philippinarum*)에서는 큰과립세포들과 작은과립세포들 그리고 투명혈액세포들이 효모나 *Bacillus subtilis*와 같은 이종생물체들을 탐식한다.

작은차거조개(*T. crocea*)의 경우에는 혈액세포들가운데서 호산성과립세포들이 이종물질을 식별할수 있다.[35] 차거조개류의 한종(*T. maxima*)에서 혈액세포들은 근육내에 주입된 탄소립자들을 위족을 재빨리 펴고 끌어들인다.[40]

조개류의 혈액세포들에서 과립세포들은 조가비재생에 관여한다.[45]

바다돌조개 *Perna viridis*의 혈액세포들은 피막을 형성하는데 참가한다.[27]

참굴(*Crassostrea gigas*)의 혈액세포들에서는 연독물질들에 의한 세포독성이 나타나지 않는데 그것은 이 물질들을 높은 농도로 축적하고 무독화하는 적극적인 보호물림새에 의한 조기응답과 관련된다.[18]

조개류에서 혈액세포들은 몸안의 항상성을 유지하는 구성요소의 하나이다. 조개들은 산소가 결핍되여도 살아남는데 산소결핍에 저항하는 세포적특성들을 많이 가지고있기때문이다. 조개류의 혈액세포들에서 변동되는 산소농도에 대한 견딜성이 높은것은 부분적으로는 사립체의 특성과 관련되여있다.[19]

이와 같이 조개류의 혈액세포들은 면역을 비롯한 자체방어에서 중요한 역할을 하며 여러가지 과정들과 밀접한 관계를 가지므로 혈액세포들의 기능에 대한 연구를 폭넓고 심도있게 진행하여야 한다.

또한 조개류에서 혈액세포들의 면역능력을 높이고 죽는률을 낮추기 위한 문제도 적극적으로 풀어나가야 한다.

맺 는 말

조개류에서 혈액세포들의 형태학적특징은 세포질과립의 유무에 따라 과립세포와 무과립세포로 갈라볼수 있다.

조개류의 혈액세포들은 체내방어에서 중요하고 중심적인 역할을 하며 상처아물기와 조가비의 재생, 소화, 운반 그리고 배설과 같은 다른 많은 과정들에 참가한다.

참 고 문 헌

[1] 최윤철; 조선수산, 2, 28, 주체103(2014).
[2] 박충혁 등; 생물학, 4, 30, 주체104(2015).
[3] 김룡길 등; 조선수산, 4, 19, 주체104(2015).
[4] А. А. Кудряцев и др.; Гематология животных и рыб, М. Колос, 320～332, 1969.
[5] Н. Т. Иванова; Атлас клеток крови рыб, М. Легкая и пищевая промышленность, 12～81, 1983.
[6] M. Auffret; Bivalve Hemocyte Morphology, American Society Special Publication, 169～177, 1989.
[7] E. Bachère et al.; Aquaculture, 132, 17, 1995.
[8] G. Balouet et al.; Aquaculture, 34, 1, 1983.
[9] M. A. Barracco et al.; Fish & Shellfish Immunol., 9, 387, 1999.
[10] C. J. Bayne et al.; J. Invertebr. Pathol., 34, 1, 1979.
[11] M. P. Cajaraville et al.; Acta Histochem. Cytochem., 28, 409, 1995.
[12] M. J. Carballal et al.; Dis. Aquat. Org., 29, 127, 1997.
[13] Su-Jung Chang et al.; Zoological Studies, 44, 1, 144, 2005.
[14] D. P. Cheney et al.; Biol. Bull., 140, 353, 1971.
[15] T. C. Cheng; Bivalves, Invertebrate Blood Cells, Academic Press, 233～300, 1981.
[16] T. C. Cheng et al.; J. Invertebr. Pathol., 26, 341, 1975.
[17] F. Cima et al.; Fish & Shellfish Immunol., 10, 677, 2000.
[18] F. M. Danielle et al.; Marine Drugs, 10, 583, 2012.
[19] L. Donaghy et al.; Aquatic Living Resources, 26, 257, 2013.
[20] E. A. Dyrynda et al.; Cell Tissue Res., 289, 527, 1997.
[21] D. A. Foley et al.; Biol. Bull., 146, 343, 1974.
[22] S. E. Ford et al.; J. Invertebr. Pathol., 64, 114, 1994.
[23] W. E. Hawkins et al.; Trans. Am. Microsc. Soc., 101, 241, 1982.
[24] P. M. Hine et al.; Fish & Shellfish Immunol., 9, 367, 1999.
[25] J. E. Huffman et al.; J. Invertebr. Pathol., 40, 68, 1982.
[26] D. S. Milford; https://www.nefsc.noaa.gov/nefsc/Milford/mas 2014/cr
[27] S. S. Jayaraj et al.; Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 4, 2, 138, 2009.
[28] S. Jamili et al.; Research Journal of Environmental Sciences, 3, 218, 2009.
[29] C. López et al.; Fish & Shellfish Immunol., 7, 595, 1997.
[30] Ludovic Donaghy et al.; Aquatic Living Resources, 26, 257, 2013.

[31] Mauro de Freitas Rebelo et al.; National Center for Biotechnology Information, 8, 2, 2013.
[32] M. N. Moore et al.; J. Invertebr. Pathol., 29, 18, 1977.
[33] S. H. Mortensen et al.; Fish & Shellfish Immunol., 6, 111, 1996.
[34] M. G. McCormick-Ray et al.; J. Invertebr. Pathol., 58, 219, 1991.
[35] K. Nakayama et al.; J. Invertebr. Pathol., 69, 105, 1997.
[36] D. Noël et al.; Mar. Biol., 119, 549, 1994.
[37] C. Paillard et al.; Aquat. Living Resour., 9, 145, 1996.
[38] R. K. Pipe et al.; Cell Tissue Res., 289, 537, 1997.
[39] L. P. D. Rasmussen et al.; J. Invertebr. Pathol., 45, 158, 1985.
[40] P. Reade et al.; J. Invertebr. Pathol., 28, 281, 1976.
[41] T. Renault et al.; Fish & Shellfish Immunol., 11, 269, 2001.
[42] F. Russell-Pinto et al.; Fish & Shellfish Immunol., 4, 383, 1994.
[43] K. Terahara et al.; Dev. Comp. Immunol., 30, 667, 2006.
[44] M. R. Tripp; J. Invertebr. Pathol., 59, 222, 1992.
[45] Vyacheslav Dyachuk; Fisheries and Aquaculture Journal, 9, 2, 2018.
[46] C. M. Wen et al.; Comp. Biochem. Physiol., 108A, 279, 1994.
[47] E. C. Wootton et al.; Fish & Shellfish Immunol., 15, 249, 2003.
[48] J. Xing et al.;. Fish & Shellfish Immunol., 13, 271, 2002.
[49] Yanhai Xie et al.; Aquaculture, 310, 245, 2011.
[50] W. Z. Zhang et al.; Aquaculture, 251, 19, 2006.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Morphological Characteristics and Function of Hemocytes in Bivalves(Bivalvia)

Kim Ryong Gil, Ryu Ho Jin

The morphological characteristics of hemocytes in bivalves were identified on the basis of the existence of cytoplasmic granules.

Hemocytes of bivalves play an important and central role in the internal defense and are involved in other processes like wound and shell repair, nutrient digestion, transport and excretion.

Key word: bivalvia, hemocytes, morphological characteristics

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

식물기생성선충의 방지에서 식물호르몬 쟈스몬산의 응용가능성

김 철 우

토양속에 살고있는 식물기생성선충은 밭작물과 남새류의 뿌리부에 큰 피해를 주고있다. 이러한 선충의 대부분은 1mm이하의 크기를 가진 눈으로는 확인하기 어렵고 생활장소와 분포범위가 넓으며 또 견딜성이 강한 종은 불리한 환경에 대한 적응력이 강하여 오랜 기간 생존하며 숙주식물에 의존하기때문에 그 밀도도 높다. 식물기생성선충이 기생하는 식물은 물과 영양물질흡수가 저해되는 결과 생장이 심히 억제되며 심한 경우에는 말라죽기도 한다. 식물기생성선충에 의한 농작물피해는 세계적으로 매해 수천억t에 달한다고 추정되고있는데 그 1/4이상은 토양에서 생활하고있는 뿌리혹선충(*Meloidogyne*속)에 의하여 발생한다. 특히 700종이상의 넓은 숙주범위를 가진 고구마선충(이하 선충으로 표기)은 밭뿌리남새류로부터 온실열매남새류에 이르는 많은 작물과 식물에 매우 심각한 피해를 주고있다. 이러한 선충은 식물의 뿌리에 기생하는데 선충이 기생하는 뿌리의 부위는 혹모양으로 팽창되여 새로운 곁뿌리의 발달이 정지되는것과 함께 물과 영양물질의 흡수가 저해된다.

뿌리남새류는 선충의 기생에 의해 피해부가 혹모양으로 되여 상품의 가치를 떨구며 지하부에 열매를 맺는 열매남새류에서도 선충의 기생에 의하여 지상부의 생장이 억제되여 수확량과 품질이 낮아진다.

또한 선충이 뿌리에 상처를 내면서 감염하고 기생하기때문에 그 상처부를 통해 토양병원균이 침입하면서 복합병피해를 입는 경우도 많다. 한번 포전에 선충이 발생하면 막기 어렵기때문에 선충은 가장 유해로운 병해충의 하나로 되고있다.

현재 환경에 영향을 적게 주는 효과적인 선충방지법을 개발하는것이 중요한 문제로 제기되고있는데 최근 환경보존형방지법의 유망한 재료로서 주목을 모으고있는것이 바로 병해충저항성유도물질(식물호르몬)이다.

병해충저항성유도물질은 식물이 원래 가지고있는 병해충에 대한 저항성을 높이는것으로서 내병성, 내충성을 유도하여 병해충방지효과를 나타내며 따라서 환경오염도 적다. 또한 병원체나 해충을 직접 죽이는 작용은 없다는데로부터 살충제리용때 문제로 되는 생태형의 출현이 낮은 우점이 있다.

론문에서는 선충피해억제제로서의 병해충저항성유도물질의 실용가능성에 대해 소개한다.

1. 선충방지의 연구실태

이전의 선충방지기술은 화학적방지, 물리적방지, 농업경영적방지로 나누어볼수 있는데 주류는 화학적방지로서 기본은 화학합성농약의 사용이다. 선충방지제로서의 화학합성농약은 알갱이제와 훈증제로 나누어볼수 있다. 알갱이제로는 유기린제, 훈증제로서는 D-D제가 널리 보급되고있다.

물리적방지기술에는 비닐집을 밀폐하고 경작지를 가온하는 태양열토양소독과 비닐집 토양에 유기물질을 혼합하고 밀폐한 다음 가온하는 환원토양소독, 가동식보이라로 토양을 직접 가열하는 열수토양소독 그리고 토양의 장기간 담수처리 등이 속한다.

농업경영적방지기술로는 재배토양중의 선충밀도를 감소시키는 선충대항식물이나 선충저항성품종의 재배를 들수 있다.

그러나 우에서 렬거한 재배기술에는 각각 적지 않은 문제점들이 있다. 실례로 유기린산계화학합성농약은 재배작물에서 그 잔해가 확인되여 사회적으로 문제로 되고있고 토양훈증제도 인체에 미치는 영향, 토양미소생물상의 파괴와 교란, 지하수오염 등 환경오염을 일으킨다. 화학적방지나 물리적방지는 대체로 방지되여야 할 선충이 경작지토양의 깊은 층에 있기때문에 1～2번의 경작후에는 선충밀도가 급속히 회복되여 오히려 선충에 의한 피해가 조장되는 경우도 있다. 농업경영적방지대책인 길항식물의 재배는 작물재배의 중단 및 김매기의 로력과 품, 다른 병해충의 유도 등의 문제가 있다. 또한 이러한 선충방지방법들은 모두 선충을 직접 죽이거나 불활성화시키는것을 목적한것으로서 식물의 방어반응을 강화하는것과 같은 수법은 아니다. 이렇게 이전의 선충방지방법들은 모두 피동적이고 어느것이나 다 결정적인것이 못된다. 특히 화학적방지나 물리적방지는 환경에 주는 영향이 크다.

최근 통합병해충경영방지나 환경보존형농업, 지속적농업으로 불리우는 환경을 고려한 농업체계를 구축하는 방법이 제기되고있으며 환경오염의 실질적인 방지방법으로 전환될것을 요구하고있다.[1, 3] 그러므로 이전의 방지방법을 대신하는 환경보호에 유리한 방지방법의 응용가능성을 탐색하기 위하여 병해충저항성유도물질의 선충피해억제효과를 검증하는 연구들이 활발히 진행되고있다.

2. 선충피해억제에서 병해충저항성유도물질의 응용가능성

식물은 항상 생태환경의 변화나 병원성미생물의 감염, 곤충 등에 의한 먹음피해와 같은 여러가지 스트레스에 처해있으므로 이러한 스트레스에 대응하기 위해 식물은 자기의 독자적인 방어물림새를 발달시켜왔다. 이러한 방어물림새를 발현시키는데서 식물호르몬으로 불리우는 저분자화합물이 신호전달물질로서 중요한 역할을 담당하고있다. 실례로 환경의 변화(건조, 저온, 높은 염농도 등)에 대해서는 압씨신산(ABA)을, 병원균의 감염에는 살리칠산(SA)을, 곤충의 먹음피해 등을 받으면 쟈스몬산(JA)을 식물은 몸안에서 생합성하고 이러한 스트레스에 견디기 위하여 방어기능을 수행하는 여러가지 단백질을 합성한다[1, 2]는것이 밝혀지고있다. 특히 병해충에 대한 식물의 방어응답은 JA에 의하여 조절되는 JA경로, SA에 의하여 조절되는 SA경로, 에틸렌(ET)과 JA에 의하여 조절되는 ET/JA경로로 크게 나누어 볼수 있다. 이러한 병해충저항성에 관계되는 식물호르몬을 리용하면 이전보다 환경오염을 줄이는 방지방법을 세울수 있다고 보고있다.[3, 4]

선충은 식물의 뿌리에 상처를 내고 뿌리안에 침입하여 기생한다. 지하부에서의 식물방어응답에 대해서는 아직까지 명백치 못한 점은 있지만 이때 식물체안에서는 그 어떤 방어응답이 일어난다고 예상된다. 지상부에서 상처나 해충의 먹음피해를 받는 경우 식물은 몸안에서 스트레스호르몬인 쟈스몬산을 생성하고 그것을 신호전달물질로 하여 신속히 방어응답을 시작한다. 더우기 외부에서 쟈스몬산을 산포하는 경우 식물이 미소해충인 선충에 의

한 먹음피해를 적게 받는다는 자료[3, 5]도 알려지고있다. 따라서 식물지상부에서의 해충에 대한 방어응답과 류사한 현상이 지하부의 선충에서도 생겨난다고 가정하고 쟈스몬산을 리용한 선충방지의 가능성이 검토되였다.[5, 6]

실험식물로는 도마도(*Lycopersicum esculentum*)를 리용하였다. 이 도마도품종은 선충저항성유전자(*Mi*-gene)를 가지고있는 품종으로 알려져있다. 그러나 주요도마도생산지에서는 이 저항성유전자산물의 영향을 받지 않는 선충계통이 이미 만연하고있으며 이로부터 이러한 선충을 방지하는것이 중요한 과제로 제기되고있다. 때문에 저항성기피계통의 선충과 선충저항성유전자를 보존한 도마도품종을 조합하여 도마도에 JA를 처리하는 경우 선충의 기생을 어떻게 변화시키는가를 해석하였다.

모래를 채운 포트에 도마도를 파종하고 싹튼 후 본잎이 2매이상 되였을 때에 JA류사체인 메틸쟈스몬산(MeJA)을 잎면에 낮은 농도(0.1mmol/L)와 높은 농도(1.0mmol/L)로 각각 처리하였다. 각 농도의 MeJA를 잎면산포한 2일후에 200마리의 선충을 그루에 접종하고 선충접종후 1～2주일후에 도마도지하부를 채취하고 뿌리내부의 선충을 염색하는 방법으로 선충의 침입개체수를 측정하였다. 그 결과 낮은 농도의 MeJA처리구에서는 선충의 감염이 억제되지 않았는데 높은 농도의 처리구에서는 1주일후에 선충의 감염이 유의하게 억제되였다. 그러나 선충접종후 2주일 지나면 높은 농도 MeJA처리구에서 나타난 선충감염억제효과도 떨어지며 무처리와 비교하여도 선충감염수에서 차이가 없었다.

선충접종 1주일후의 선충감염수판정결과로부터 MeJA처리농도에 따라 선충억제효과에서 차이가 있다는것이 판명되였다. 이로부터 JA의 생성이나 작용에 참가하는 식물유전자무리의 발현이 JA처리농도에 의하여 변화되지 않는가를 해석하였다.[4, 5] 그 결과 높은 농도 MeJA처리구에서는 JA경로가 활성화되였지만 낮은 농도 MeJA처리구에서는 JA경로가 거의 활성화되지 않았다는것이 밝혀졌다. 이 결과는 JA경로의 활성화가 선충의 침입억제효과와 정의상관을 나타낸다는것을 보여주는것으로 된다. 더우기 MeJA처리후 1주일정도에서 높은 농도 MeJA처리구에서도 JA경로의 활성화는 낮아졌으며 그것과 동시에 선충감염억제효과도 나타나지 않았다. 이것으로부터도 JA경로의 활성화가 선충억제효과를 나타낸다는것이 명백하다고 볼수 있다. 이미 병충해억제에 관계한다는것이 알려져있는 단백질분해효소억제제나 말티시스타틴(multicystatin) 등의 유전자가 발현될 때 선충의 침입은 억제되며 이외의 JA관련유전자보다도 현저한 상관을 나타낸다고 할수 있다. 이렇게 밀접한 상관을 가지는 유전자는 어느것이나 식물체안에서 효소반응저해를 담당한 유전자이며 선충이 뿌리에 감염한 후에 정착, 기생할수 없도록 억제하는데서 중요한 유전자라고 지금까지 생각하여왔다. 이러한 유전자가 식물체안에서 발현되고있는 사이에 선충을 접종하면 감염자체가 억제된다는데로부터 초기의 침입을 막기 위해서도 이러한 유전자발현이 중요하다는것이 판명되였다. 그러나 유전자발현 그자체가 식물에로의 선충의 침입을 억제하였는가는 명백하지 않으며 유전자발현에 따르는 선충기피물질이 방출되였거나 혹은 선충유인물질의 방출이 정지되였을 가능성이 있기때문에 앞으로 보다 연구가 심화되여야 한다고 보고있다.[2, 5] 이상의 결과로부터 낮은 농도의 MeJA처리로는 선충의 감염을 억제할수 없지만 높은 농도의 MeJA의 처리는 감염을 억제한다는것이 판명되였다. 그러나 이 억제효과가 약 1주일밖에 지속되지 않는다는것도 밝혀졌다. 그러면 1주일사이에 높은 농도의 MeJA을 계속 처리하면 선충감염의 억제가 계속되는가 하는 문제를 검토하기 위하여 1주일사이에 1.0mmol/L의

MeJA를 계속 산포하고 선충감염의 억제정도를 조사하였다. 그 결과 1주일사이에 MeJA를 산포하면 선충감염억제효과가 회복되였다. 또한 선충의 1세대가 완료될 때까지 약 1개월간 매주 MeJA를 계속 산포한 경우 뿌리에 부착하는 알의 수도 유의하게 낮아졌다. 선충접종전에 한번만 MeJA를 처리하여도 알의 수는 유의하게 낮아졌으며 더우기 유전자발현이 억제되는 적당한 시기를 맞추어 1주일마다 여러번 MeJA를 처리하면 알의 수가 보다 적어졌다. 이것은 MeJA처리에 의하여 JA경로가 활성화되여 단백질분해효소억제제나 말티시스타틴 등의 유전자가 계속 발현되는 상태를 의도적으로 조성하는것으로 초기의 감염을 막는것과 함께 감염한 선충에 대해서도 뿌리에 정착, 기생하는것을 저지시키는것과 관련된다고 보고있다. 이렇게 MeJA를 적절한 농도로 적절한 시기에 식물에 계속 처리하면 선충의 감염이나 기생을 유의하게 감소시키는것이 가능하였다. 더우기 우에서 본것처럼 JA경로의 활성화는 지상부해충의 방지에도 유효하다고 보고있으며 JA(MeJA)를 능숙하게 활용하면 지상부, 지하부 량쪽의 해충방지에 동시에 리용할수도 있다.

그러나 MeJA를 식물에 처리하면 선충감염을 억제하는 등의 우점만이 아니라 결함도 있다. JA는 식물호르몬이기때문에 그 리용에 의하여 다른 식물호르몬의 기능이나 내재량이 변화되는 결과 재배작물의 생장과 분화에서 이상현상이 나타나는 등 농업경영상 좋지 못한 형질을 나타낼 가능성이 있다. 특히 JA경로는 해충저항성유도만이 아니라 생장을 담당한 경로에도 있다고 보고있다. 사실 높은 농도로 처리하는 경우 생장억제가 나타난다. 또한 정도이상 높은 농도의 MeJA를 처리한 식물은 잎이 뜨거운 물에 덴것 같은 증상을 나타내는 등의 약해문제도 밝혀지고있다.[6, 7]

3. JA경로에 의한 식물방어를 리용한 선충피해억제의 응용가능성

MeJA를 처리하여 JA경로가 활성화된 도마도에서 선충의 감염이 억제된다는것이 밝혀졌다. 도마도에서는 유전자변이체를 얻기 힘들기때문에 대신에 애기장대를 실험식물로 리용하였다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 모형실험식물로서 여러 분야에 쓰이고있으며 2000년에 전 게놈배렬이 해석되였기때문에 유전자파괴계통이나 유전자과잉발현계통이 구비되여있다.[8, 9]

리용한 계통은 야생그루와 JA에 대한 감수성을 잃은 *coi1-1*변이체, JA에 대한 감수성이 높고 JA무처리때에도 JA경로가 활성화되여있는 *sa*변이체이다.[10]

모래를 채운 포트에 애기장대를 파종하고 싹튼 후 잎이 충분히 펴졌을 때 MeJA를 처리하였다. 애기장대는 도마도에 비하여 JA에 대한 감수성이 높기때문에 0.1mmol/L의 MeJA를 처리하였다. MeJA를 처리한 2일후에 200마리의 선충을 그루주변에 접종하였다. 선충접종후 1주일후에 지하부를 채취하고 뿌리안의 선충을 염색하는 방법으로 선충의 침입개체수를 측정하였다.

그 결과 애기장대에서도 MeJA처리에 의하여 JA경로가 활성화되면 선충의 침입이 억제된다는것이 밝혀졌다. MeJA를 처리하지 않아도 JA경로가 활성화되여있는 *sa*변이체에서도 선충의 침입은 MeJA를 처리하지 않은 야생그루에 비하여 유의하게 억제되였다. 그러나 *sa*변이체에서 MeJA을 처리한 구와 처리하지 않은 구의 선충침입수에서는 그 차이가 나타나지 않았다. 유전자발현량이 어느 정도의 수준을 넘으면 선충감염억제효과에서 차이가 나

타나지 않게 된다는것이 밝혀졌는데 이때 야생그루, *sa*변이체와 함께 도마도와 마찬가지로 시스타틴유전자발현과 선충침입수저하사이에 상관이 나타났다. 이로부터 선충의 감염억제에는 식물종에 관계없이 JA관련유전자 특히 시스타틴효소반응에 관계되는 유전자의 발현이 관여하고있다는것을 예측할수 있다.

한편 MeJA에 의한 JA관련유전자의 발현이 유도되지 않는 *co1-1*변이체에서 선충의 침입수는 야생그루에서보다도 유의하게 적었다. *co1-1*변이체는 JA경로자체가 활성화되지 않는 변이체이기때문에 MeJA를 처리하여도 JA경로가 활성화되지 않는다. 그럼에도 불구하고 선충의 침입수는 야생그루의 MeJA처리때와 비슷하였다. 선충의 침입이 야생그루보다도 억제되였다는데로부터 선충이 뿌리에 침입할 때 JA경로를 리용하며 JA경로가 존재하지 않으면 감염이 성립되지 않을 가능성이 있다. 이 결과로부터 선충의 뿌리에로의 침입과 그 억제는 JA경로가 깊이 관여하고있다는것과 함께 JA경로의 존재와 그 활성화에 의하여 선충의 침입이 억제된다는것을 알수 있다.

맺 는 말

JA경로의 유전자무리의 활성화와 혹선충침입억제사이에 관련이 있다는것이 명백해졌다. 또 JA경로자체가 결여되여도 침입이 억제된다는것도 판명되였다. 그러나 쟈스몬산의 제조원가가 높기때문에 현 시점에서는 실천에 도입하기는 힘들다고 보고있다. JA경로가 결여된 품종의 육종도 현 시점에서는 현실적인것으로는 되지 못한다. 따라서 선충에 대한 유효한 저항성유도제를 개발하기 위하여서는 쟈스몬산경로를 활성화시키는 쟈스몬산 및 그 류사체이외의 화합물을 탐색하는것이 중요하다고 본다.

실험을 통하여 선충의 감염억제효과와 유효한 상관을 가진 유전자를 몇가지 얻을수 있었다. 이러한 유전자의 발현이 직접 선충의 감염억제효과를 가져온다고 보기는 힘드나 유전자발현에 따르는 식물체안의 물질방출량과 축적량의 변화에 의하여 선충의 감염이 억제될 가능성이 높다. 이러한 물질의 변화를 선충이 민감하게 인식하고 침입하지 않는다고 볼수 있기때문에 앞으로는 쟈스몬산처리에 따라 식물체에서 방출되는 물질의 변화에 초점을 두고 선충감염억제효과를 가지는 물질이 존재하지 않는가가 검증되여야 한다. 이러한 연구는 앞으로 보다 실질적인 선충방지효과와 함께 응용가능성도 높은 물질의 탐색으로 되여야 한다는것이 연구자들의 공통된 견해이다.

참 고 문 헌

[1] T. Uehara et al.; Plant Mol. Biol., 71, 185, 2015.
[2] C. Girard et al.; New. Phytol., 181, 841, 2015.
[3] M. Goulet et al.; Plant Physiol., 148, 1010, 2010.
[4] E. Bouchard et al.; Mol. Ecol., 22, 2439, 2013.
[5] S. Annadana et al.; Transgenic Res., 21, 437, 2012.
[6] J. Wu et al.; Comp. Biochem. Physiol., C 127, 209, 2000.
[7] Y. Kouzuma et al.; J. Biochem., 128, 161, 2000.

[8] M. E. Gendron et al.; Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 298, 2026, 2010.
[9] M. Sulaiman et al.; Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 298, 833, 2010.
[10] D. K. Das et al.; Heart Fail. Rev., 15, 467, 2010.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

An Application Possibilities of Jasmonic Acid in Prevention of Plant Parasitic Nematode

Kim Chol U

Jasmonic acid, the plant hormone, is an inducer of the resistance to damage by nematode. It is considered as the prospective material in conservation of the environment and control of the nematode.

Key words: plant parasitic nematode, plant hormone, jasmonic acid

김일성종합대학학보 주체108(2019)년
생명과학 제65권 제4호

병원체를 알아내는 나노감수기

김 광 원

경애하는 최고령도자 **김정은**동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《현대의학발전추세에 맞게 앞선 진단, 치료방법을 적극 받아들이고 신의학과 고려의학을 밀접히 결합시키며 먼거리의료봉사체계를 완비하고 구급의료봉사를 비롯한 의료봉사의 질을 높은 수준에서 보장하여야 합니다.》

치료예방사업을 발전시키고 의료봉사의 질을 개선하자면 여러가지 선진적인 진단과 치료방법을 적극 받아들여야 한다.

최근년간 20min내에 병원체를 알아내는 새로운 감염증진단기가 개발되여 검사시간을 대폭 줄이고 많은 환자들의 생명을 구원할수 있게 되였다. 일반적으로 감염증을 검사하고 병원체를 알아내는데는 많은 시간이 걸린다. 시료에 들어있는 병원체의 DNA량이 아주 적기때문에 검사가 어려운것이다. 며칠씩 걸리는 검사기간에 환자는 잘못 진단한 약을 처방받거나 병증세가 악화되고 혹은 적절한 의료봉사를 받지 못할 우려가 있다. 나노규모의 미소세계에서 진행되는 화학반응을 리용한 새로운 장치를 가지고 정확한 검사결과를 신속히 얻어낼수 있다. 진료소현장에서의 신속하고 정확한 의료봉사가 현실화되고있다.

1. 감염증신속진단연구의 경위

감염증을 현장에서 진단하는것이 왜 그렇게 어려운가? 체온이나 혈압 등은 일상적으로 잴수 있지만 많은 감염증에 대하여서는 원인을 신속히 확정할수 있는 방법이 아직 없다. 해로운 세균이나 비루스를 인차 확정하지 못하면 환자의 병상태는 더 심해진다. 병원체의 확정에는 보통 며칠씩 걸리기때문에 그사이 병증세가 심해져 치료가 힘들어지고 어린이나 로인, 면역계가 제대로 작용하지 않는 사람 등 체력이 약한 환자들의 대부분은 목숨을 잃게 된다.

이런 현상은 발전된 나라들의 의료기관들에서도 나타나고있다. 한편 아프리카나라들의 작은 진료소들에서는 검사결과를 얻는데 다시 또 며칠이 걸리며 사태는 더욱 험악해진다. 그사이 잘못 진단하여 말라리아에 걸린 환자에게 장티브스치료를 하거나 에볼라출혈성열병(병원체는 에볼라비루스이며 배설물을 통해 전파)에 걸린 환자를 격리시켜 오히려 죽게 하는 등의 일이 벌어진다.

검사에 시간이 걸리는것은 개개의 감염증에 특유한 분자들이 인체속에서 방대한 량의 정상단백질 등과 뒤섞여 가리워지기때문이다. 한방울의 혈액시료속에 들어있는 표식자분자(병원체를 알아볼수 있게 하는 분자)는 겨우 1 000개정도이며 이것들이 수조개나 되는 무관계한 분자들과 뒤섞여 돌아간다. 충분한 수의 목표분자(표적분자)를 찾아내여 필요한 정보를 얻는데는 고도로 숙련된 과학자들이 특별한 실험실에서 복잡하고 값비싼 장치들을 조작하여야 하기때문에 오랜 시간이 걸린다.

하지만 최근 성능이 우수한 새로운 방법이 개발되고있다. 이 방법에서는 검체를 검사기관에 보내여 무한정 시간을 끌면서 목숨을 위태롭게 하는것이 아니라 질병분자를 인차 발견하여 환자가 진료소에서 20min동안 기다리는 사이에 결과를 확정할수 있게 한다. 작은 수지용기에 들어있는 나노규모의 검출기, 직경이 십억분의 수m밖에 안되는 작은 감수기가 이 일을 한다. 수지용기에 혈액시료를 한방울 떨구면 결과가 나온다. 탐침분자들이 낮은 농도의 병원체DNA와 신속히 반응하는 한가지 리유는 그 크기가 DNA분자와 거의 같기때문이다.

크기가 중요한것이다. 작은 파도는 어마어마하게 큰 육중한 배를 흔들지 못하지만 손으로 노를 젓는 작은 뽀트에는 큰 영향을 준다. 작은 파도가 뽀트의 옆면에 부딪치면 물보라가 일고 노젓는 손이 휘청거리게 한다. 한 연구집단이 개발한 아주 작은 나노탐침은 주위의 환경(피속의 액체성분)에 응답하고 종래의 큰 감수기로는 느낄수 없는것을 신속히 검출할수 있다.

새로운 검사체계는 인차 림상시험을 하게 된다.[1, 2] 그외에도 다른 연구집단들에 의하여 나노규모의 반응을 리용한 몇가지 유망한 진단기술이 개발되고있다.[3. 4] 원자들을 하나씩 조작하여 재료를 조립하는 방법이 과거 10년동안 부단히 개선되였다. 세계적으로 여러 연구집단이 이 정밀기술을 리용하여 종래의 큰 감수기보다 목표(표적)에 대하여 특이적으로 재빨리 반응하는 장치를 개발하고있다.[5] 새로 시험제작한 감수기는 현실의 의료현장에서 성능이 잘 나타나지 않는 실례도 드문히 있기때문에 완전무결하다고는 볼수 없다. 하지만 이러한 나노감수기가 앞으로 의료현장에 널리 도입되리라는것은 의심할 여지가 없다.[6−8]

2. 병원체를《낚아내는》방법

이 분야의 연구가 시작된것은 약 10년전이다.[2] 당뇨병환자들이 리용하고있는 간단하고 편리한 휴대용혈당값추적기의 훌륭한 성능이 연구의 실마리로 되였다. 이 장치에서는 포도당분자가 일부 전자를 내보내는데 따라 회로가 닫기면서 전류가 흐른다. 같은 방법으로 세균이나 비루스의 DNA단편이나 RNA단편을 계측할수 있다는 착상이 나오게 되였다. 그러한 핵산의 배렬은 병원체의 존재를 보여주는 특이적인 표식자로 된다.

이것을 실현하자면 혈액시료속에 존재하는 병원체기원의 DNA분자를 끌어당겨 붙잡는 방법이 연구되여야 한다. 말하자면 병원체를《낚아내야》하는데 낚시질을 하자면 미끼가 있어야 한다. 다행히 어느 DNA단편이나 상보배렬의 DNA와 특이적으로 강하게 결합하는 성질이 있는데 그러한 상보배렬DNA를 설계하여 합성하면 되는것이다. 실례로 포도알균의 어떤 균그루에 대하여 그것을 낚아내는 미끼DNA단편을 만든다. 오직 그 균그루만이 무는 미끼로서 특이성이 강하다. 이 미끼를 굵기가 1mm인 금으로 된 도선에 붙인다. 세균의 DNA가 미끼에 물려 들어붙으면 금도선으로부터 전자가 방출되여 전류가 생긴다. 금을 리용한것은 그것의 전도성이 좋기때문이다.

하지만 DNA자체는 전자를 방출하기 힘들며 금도선으로부터 충분한 전자를 끌어낼수 없기때문에 검출가능한 전류가 생기지 않는다. 그러므로 증폭기를 추가하기로 하였다. 검사시료에 루테니움이라는 금속을 포함하는 분자를 섞었다. 이 금속은 양전하를 띠고있기때문에 음전하를 띤 DNA에 들어붙는다. DNA분자가 감수기에 결합하면 금속루테니움도 함께 들

어붙는다. 이 금속－DNA복합체는 금도선으로부터 쉽게 전자를 끌어내기때문에 검출가능한 전류가 생긴다. 감수기표면에 붙이는 미끼분자의 종류를 바꾸면 다른 세균의 DNA들도 동정할수 있다.

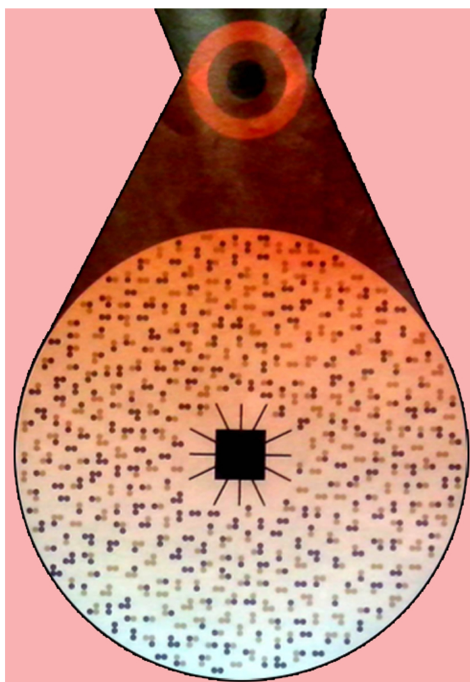
하지만 유감스럽게도 이 방법은 현실에 가까운 정황에서는 성능이 잘 나타나지 않았다. 세균기원의 DNA를 많은 량(수조개) 포함하는 시료를 리용한 실험에서는 성능이 잘 나타났지만 의사가 실제로 채혈한 시료에 들어있는것과 같은 수준에서는 성능이 제대로 나타나지 않았다. 그러한 실제의 시료에 들어있는 표적분자는 대체로 1 000개이하이다. 조건을 좀 완화시켜 100만개의 표적분자를 포함하는 시료를 분석하였는데 거기서도 감수기는 검출신호를 내지 않았다. 결국은 초기의 연구가 실패로 끝났다.

연구자들은 1년나마 품을 들여 체계를 총 점검하고 분자수가 적으면 검출이 불가능해지는 원인을 해명하려고 노력하였다. 초조하게도 어떤 개선대책을 강구하여도 감도는 조금도 높아지지 않았다. 연구집단에 망라된 일부 사람들은 이 방법에 해결책이 없다고 단념하자는 의견도 제기하였다. 실패의 반복에 위구를 느끼고 이대로 과연 연구과제가 성공겠는지 걱정하는 사람들도 있었다.

하지만 다행히도 뜻밖의 발견이 이루어졌다. 어느날 연구집단은 다른 연구과제의 실험에 대한 론의를 하게 되였다. 여기서도 금도선이 리용되였는데 크기는 훨씬 작았다. 직경이 겨우 10nm(1억분의 1m)이고 기껏해야 5개의 DNA분자가 붙을 자리밖에 없는 나노도선이였다. 그래서 다른것은 그대로 하고 감수기에 리용하였던 mm크기의 금도선대신 이 작은 나노도선을 설치한 다음 즉석에서 실험을 진행하여 어떤 변화가 일어나는가를 살펴보았다. 병원체를 알아내는 나노감수기의 확대사진은 그림 1과 같다.

실험결과는 상상밖이였다. 나노도선으로 바꾼 결과 감도가 100만배로 높아졌다. 실험을 거듭 해보아도 결과는 엄연한 사실이였다. 혈액시료속의 1 000개의 분자를 붙잡아서 질병을 진단할수 있는 새로운 방법이 확립된것이다.[1]

나노도선을 리용하면 왜 낮은 농도의 DNA검출이 가능해지는가? 그것은 도선이 나노의 크기로 되면 그 모양이 크게 달라지기때문이다. 보통의 굵은 도선의 표면은 평탄하지만 나노크기까지 가늘게 하면 표면에 뾰족한 작은 가시모양의 돌기들이 수많이 생긴다. 이 돌기의 량쪽 면에 붙은 미끼분자들의 경우 주위에 넓은 공간이 생기지만 굵은 도선(미크로도선)의 평탄한 표면에 밀집되여 《숲》을 이루는 경우에는 그렇지 못하다.(그림 2) 액체가 이 공간을 보다 쉽게 흘러가면서 표적분자가 통과해들어가 미끼분자와 표적분자가 접촉할 기회가 훨씬 많아지게 되는것이다.


그림 1. 병원체를 알아내는 나노감수기의 확대사진

이 탐침의 성능은 아주 좋았지만 손작업으로는 하루에 10개밖에 만들지 못하였다. 림상에서 실제로 사용하려면 수천개나 필요하다. 그러므로 전자장치의 대

량생산을 전문하는 많은 과학자, 기술자들의 방식대로 실리콘을 리용하기로 하였다.

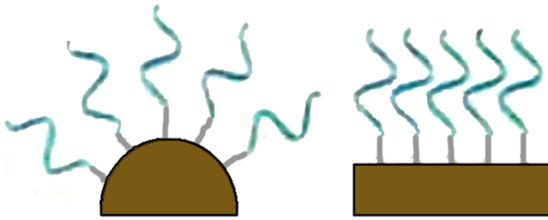


그림 2. 나노도선(왼쪽)과 미크로도선(오른쪽)의 표면에 미끼분자들이 붙은 모식도

나노도선의 곡면에 미끼분자들이 붙기때문에 틈새에 넓은 공간이 열리며 이 공간에 표적분자들이 흘러들어와 미끼분자와 결합하기 쉬워진다. 미크로크기의 굵은 도선의 표면은 평탄하기때문에 미끼분자들이 너무 밀집되여 검출이 불가능해진다.

실리콘소편은 전극을 붙일수 있고 대량생산이 가능하다. 그러한 소편우에 크기가 10nm인 돌기(나노도선의 감도를 대폭 높인 가시모양의 도드리)를 만들면 된다. 반년정도 지나서 전기도금을 리용한 우수한 방법이 완성되였다.

먼저 실리콘소편에 mm크기의 약간 큰 구조를 만들고 그우에 전기도금으로 금의 얇은 층을 만든다. 이렇게 하면 금의 둥근 지붕우에 수많은 가시들이 붙은 밤송이와 같은 구조(그림 3)가 생기며 나노도선을 성장시키기보다 간단하고 손쉽고 빠르다는것이 알려졌다.

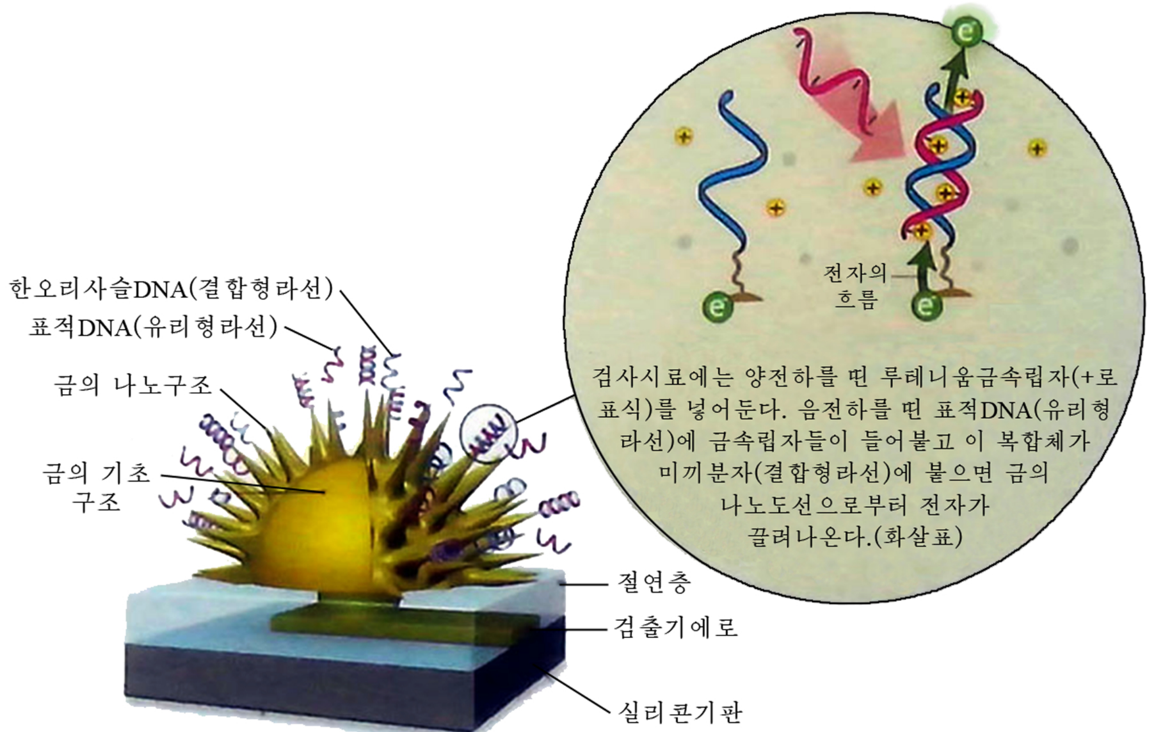


그림 3. 사소한 물림새로 의미가 큰 반응이 실현되는 모식도

한방울의 혈액시료에 들어있는 극미량의 병원균DNA분자를 검출하기 위하여서는 나노감수기에 세가지 요소가 필요하다. 즉 첫째로, 정한 세균의 DNA를 끌어당겨 결합하는 《미끼》의 역할을 하는 분자가 있어야 하며 둘째로, 미끼를 충분한 간격으로 배치하여 표적분자가 결합하기 쉽게 하기 위하여 둥근 표면으로부터 뾰족한 가시처럼 돋아나온 구조가 있어야 하며 셋째로, 표적분자가 미끼분자에 물리면 전자가 방출되여 그것을 감수기로 검출할수 있어야 한다.

가시의 끝은 사방으로 향하기때문에 거기에 미끼분자를 붙이면 초기의 나노도선표면에 돌기들이 생겨난것과 꼭같은 틈새가 생긴다. 여기서는 시간엄수가 중요하다. 전기도금반응을 그대로 계속하면 구조의 크기가 커져 무용지물이 된다. 반응시간을 알맞게 하려면 구조가 나노크기에 도달하였을 때 인차 끝내야 한다.

3. 가능성의 확대

그후 이 감수기를 세균감염증의 표식자해석에 쓸수 있다는것, 병원체의 유무를 20min 이내에 확정할수 있다는것이 확인되였다. 진료소에서 검사를 진행하는 경우 환자가 진료소에 있는 시간내에 결과를 얻어야 하기때문에 이 소요시간은 중요하다.

그리고 이 방법에는 다중처리(mutiplexing)라고 부르는 중요한 특징도 있다. 그것은 한번에 여러개의 병원체를 찾아내는 능력이다. 소편우에 금의 둥근 지붕을 많이 만들고 개개에 서로 다른 형의 미끼분자들을 붙여둔다. 그다음 여기에 혈액시료를 한방울 떨구면 각이한 병원체에 관한 검사를 단번에 할수 있다.

종래의 검사법들은 대부분 병원체기원의 DNA를 한번에 1개씩 조사하는것이였다. 이와는 달리 이 방법에서는 최대로 20종의 세균을 한번에 조사함과 동시에 전형적인 항생제견딜성균 5종의 DNA도 함께 검사한다. 검출의 정확도는 99%에 달하였다.

이 기술을 실용화하기 위하여 제품화사업도 동시에 진행되였다. 결과 감수기소편과 그것을 담을 수지용기를 만들고 진단검사에 필요되는 부속품 일식을 용기에 갖추어넣는 방법이 개발되였다. 인차 대표적인 성병(성적접촉으로 전염되는 감염증을 통털어 이르는 말)인 클라미디아감염증(성병중에서 4번째로 병원체가 발견되였으므로 제4성병이라고도 함)과 림질에 대하여 검출의 정확도를 조사하는 림상시험이 진행되였다.

나노기술을 리용한 유망한 검사법은 그외에도 적지 않게 알려져있다. 특정한 형의 암을 전례없는 정확도로 알아맞추는 검사법이 그 한가지 실례인데 한 연구집단은 암세포의 DNA와 반응하는 금나노립자를 개발하고 종양발생의 전단계에서 암세포를 검출하는데 성공하였다.[4] 한편 환자의 체내에 어떤 질병의 표식자분자를 계수하는 체계도 개발되였다.[3] 이와 같은 체계는 암의 진단과 감시에서 효과가 매우 클것이라고 보고있지만 이 방법들은 검사실험실에서의 리용을 전제로 설계된것들이므로 진료소에서의 적용은 불가능하다.

한편 현장진단에 주목한 기술들의 개발도 진척되고있다. 한 연구집단은 독특한 무선장치 즉 전기선이 없이 DNA검출을 가능하게 하는 장치를 개발하였다.

또다른 연구집단은 2015년에 휴대용전화기에 련결하여 쓸수 있는 소형채혈기를 개발[5]하였다. HIV(사람면역부전비루스)에 대한 항체의 유무에 의하여 HIV감염을 진단한다.[9]

이러한 기술들가운데서 몇가지는 앞으로 더 개량되여 최종적으로 의료현장에서 널리 리용될것이다. 혹은 생각지도 못했던 다른 기술들이 실용화될수도 있다.[10] 미크로메터(μm)나 나노메터(nm)의 미소세계반응이 환자들의 건강증진에 거대한 공헌을 할 날이 멀지 않았다.

참 고 문 헌

[1] S. O. Kelley et al.; Nat. Nanotechnol., 9, 969, 2014.
[2] S. O. Kelley; Sci. Amer., 11, 34, 2015.
[3] D. R. Walt; Science, 308, 217, 2005.
[4] D. A. Giljohann et al.; Nature, 462, 461, 2009.
[5] D. G. Rackus et al.; Lab on a Chip, 15, 18, 3776, 2015.
[6] J. Pellegrino et al.; Nat. Nanotechnol., 13, 728, 2018.
[7] L. Britnell et al.; Nano Lett., 18, 1707, 2018.
[8] D. J. エカ–; 日経サイエンス, 2, 28, 2015.
[9] J. A. クリッシュ; 日経サイエンス, 8, 11, 2015.
[10] S. O. ケリ–; 日経サイエンス, 3, 68, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Nanosensors to Detect Pathogens

Kim Kwang Won

New devices using chemical reactions in the microworld of nano scale yield precise test results rapidly. A rapid and precise medical service in clinics is now becoming reality.

Key words: nanosensor, pathogen, diagnostics, human disease, infectious disease

주체108(2019)년 차례묶음

제1호

제2호

제3호

제4호

Juche 108(2019)－Arrangement Bundle

Number 1

Number 2

Number 3

Number 4

JOURNAL OF
KIM IL SUNG UNIVERSITY
Life Science

Vol. 65 No. 4
JUCHE 108(2019)
(SN 579)

CONTENTS

Issued by

PUBLISHING HOUSE OF **KIM IL SUNG** UNIVERSITY

김일성종합대학학보 주체108(2019)년 제65권 제4호
생명과학 (루계 제579호)

편 집 위 원 회
낸 곳 **김일성**종합대학출판사
인쇄소 **김일성**종합대학인쇄공장
인쇄 주체108(2019)년 11월 10일 발행 주체108(2019)년 11월 20일
ㄱ－1972347 값 200원

DPR Korea
Address: Ryongnam-dong, Ryomyong Street,
Taesong District, Pyongyang
E-mail: ryongnamsan@star-co.net.kp
Fax: 0085-02-381-4410, 0085-02-381-4427

정기간행물번호
제19924호